

**(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES  
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG**

**(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum**  
Internationales Büro



**(43) Internationales Veröffentlichungsdatum**  
**21. Februar 2002 (21.02.2002)**

**PCT**

**(10) Internationale Veröffentlichungsnummer**  
**WO 02/14862 A2**

**(51) Internationale Patentklassifikation<sup>7</sup>:**

**G01N 33/53**

**(81) Bestimmungsstaaten (national):** AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

**(21) Internationales Aktenzeichen:**

PCT/EP01/09206

**(22) Internationales Anmeldedatum:**

9. August 2001 (09.08.2001)

**(25) Einreichungssprache:**

Deutsch

**(26) Veröffentlichungssprache:**

Deutsch

**(30) Angaben zur Priorität:**

100 39 393.4	11. August 2000 (11.08.2000)	DE
100 51 143.0	16. Oktober 2000 (16.10.2000)	DE
101 17 866.2	10. April 2001 (10.04.2001)	DE

**(84) Bestimmungsstaaten (regional):** ARIPO-Patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

**(71) Anmelder** (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von US): **NANOTYPE GMBH** [DE/DE]; Lochhamer Schlag 12, 82166 Gräfelfing (DE).

**Veröffentlicht:**

— ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts

**(72) Erfinder; und**

**(75) Erfinder/Anmelder** (nur für US): **GAUB, Hermann** [DE/DE]; Waldschmidtstr. 19a, 83727 Neuhaus (DE). **ALBRECHT, Christian** [DE/DE]; Thalkirchner Str. 143, 81371 München (DE).

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.

**(74) Anwalt:** **LEISSLER-GERSTL, G.**; Eisenführ, Speiser & Partner, Arnulfstrasse 25, 80335 München (DE).

**(54) Title:** METHOD AND DEVICE FOR CHARACTERISING AND/OR FOR DETECTING A BONDING COMPLEX

**(54) Bezeichnung:** VERFAHREN UND VORRICHTUNG ZUR CHARAKTERISIERUNG UND/ODER ZUM NACHWEIS EINES BINDUNGSKOMPLEXES

**WO 02/14862 A2**

**(57) Abstract:** The invention relates to a method for characterising and/or for detecting a bonding complex comprising the following steps: providing a first bonding partner and a conjugate from a second and a third bonding partner and providing a fourth bonding partner; forming a link between the bonding partners, wherein the first bonding partner combined with the second bonding partner forms a sample complex and the third bonding partner combined with the fourth bonding partner forms a reference complex; applying a force to the link, which results in the separation of the sample complex or reference complex; determining which of the bonding complexes were separated.

**(57) Zusammenfassung:** Ein Verfahren zur Charakterisierung und/oder zum Nachweis eines Bindungskomplexes weist folgende Schritte auf: Bereitstellen eines ersten Bindungspartners und eines Konjugats aus einem zweiten und einem dritten Bindungspartner und Bereitstellen eines vierten Bindungspartners, Bilden einer Verkettung der Bindungspartner, wobei der erste Bindungspartner mit dem zweiten Bindungspartner einen Probenkomplex und der dritte Bindungspartner mit dem vierten Bindungspartner eine Referenzkomplex ausbildet, Aufbringen einer Kraft an die Verkettung, die zur Trennung des Probenkomplexes oder des Referenzkomplexes führt und Bestimmen welcher der beiden Bindungskomplexe getrennt wurde.

**Verfahren und Vorrichtung zur Charakterisierung und/oder zum Nachweis eines  
Bindungskomplexes**

Die Erfindung betrifft ein Verfahren und eine Vorrichtung zur Charakterisierung und/oder zum Nachweis eines Bindungskomplexes, insbesondere mittels Unterscheidung molekularer Trennkräfte durch einen differentiellen Krafttest.

**Bindetests auf der Basis von Gleichgewichtskonstanten**

Nicht-kovalente Wechselwirkungen zwischen Molekülen beruhen auf der atomaren Interaktion von Bindungspartnern durch Wasserstoffbrücken, ionische, hydrophobe und van-der-Waals Kräfte. Schwache Wechselwirkungen sind Größenordnungen geringer als kovalente Bindungen, die durch chemische Reaktionen gebildet oder gelöst werden.

Nicht-kovalente Wechselwirkungen zwischen Bindungspartnern mit einem hohen Grad an selektiver Bindeeigenschaft sind die Voraussetzung für die molekulare Erkennung, die man sich in der chemischen Analytik und der Diagnostik zu Nutze macht. Im Folgenden werden solche Wechselwirkungen als spezifische Wechselwirkungen bezeichnet. Bei den Verfahren zum Nachweis oder der Charakterisierung biochemischer Moleküle handelt es sich meistens um Bindetests.

Ein Bindetest basiert auf der Ausbildung eines Bindungskomplexes durch die spezifischen Wechselwirkungen eines Liganden mit einem Rezeptor und dem Nachweis dieses Komplexes.

Beim diagnostischen Bindetest kommt es darauf an, eine bekannte Substanz in einer Probe nachzuweisen:

- Die Identität einer Probesubstanz zu bestimmen
- Eine Probesubstanz in einem komplexen Probegemisch nachzuweisen
- Varianten einer Probesubstanz zu unterscheiden

- Die Konzentration einer Probesubstanz zu bestimmen

Bei Bindetests für die Entwicklung neuer Diagnostika oder Therapeutika kommt es darauf an, zu einem bestimmten Bindungspartner einen passenden, noch unbekannten zweiten Bindungspartner zu finden, d.h.:

- Aus einer Vielzahl von Probesubstanzen diejenige zu identifizieren, die an einen bestimmten Rezeptor bindet
- Die Bindungskonstante der Probesubstanz zum Rezeptor zu bestimmen
- Weitere Bindungseigenschaften wie die Rate der Assoziation (on rate) oder der Dissoziation (off rate) zu bestimmen

In der Immundiagnostik handelt es sich bei den Rezeptoren i.d.R. um Antikörper oder Antikörperderivate, mit denen Antigene in Form von Proteinen, niedermolekularen Substanzen, aber auch Viren und ganzen Zellen nachgewiesen werden können.

In der molekularen Diagnostik spricht man bei dem Rezeptor von einer Sonde, die aus einer Nukleinsäure wie DNA oder RNA besteht und mit der Nukleinsäuren in einer Probe nachgewiesen werden.

Der verbreitetste immundiagnostische Test ist der enzyme linked immunosorbent assay (ELISA). Beim ELISA wird ein erster Antikörper auf einer Oberfläche immobilisiert. Er bindet selektiv ein Antigen eines zugegebenen Probegemischs über eine erste Bindestelle (Epitop). Ein zweiter Antikörper, der mit einer Markierung versehen ist und der sich in freier Lösung befindet, bindet an ein zweites Epitop des Antigens. Bei einem Separationsschritt wird die Fraktion des markierten Antikörpers abgetrennt, die nicht an das Antigen gebunden hat. Die auf der Oberfläche zurückbleibenden Sandwich-Komplexe aus erstem Antikörper, Antigen und zweitem Antikörper werden anhand der Markierung nachgewiesen. An die Markierung vermag i.d.R. ein Enzym zu binden, das mittels Bildung eines Farbstoffes das Signal entwickelt. Der Farbstoff ist letztlich das Maß für die Menge des Antigens in der untersuchten Probe.

Ein typischer molekulardiagnostischer Test ist die Southern-Hybridisierung. Sie beruht auf der Wechselwirkung eines bekannten Nukleinsäuremoleküls, der Sonde, zu einer komplementären Nukleinsäure eines Probengemischs. Die Probe wird auf einer Oberfläche immobilisiert und die markierte Sonde zugegeben. Bei geeigneten Puffer- und

Temperaturbedingungen binden die Sondenmoleküle an komplementäre Sequenzen der Probe. Nach Separation der nicht gebundenen Sonde werden die gebildeten Nukleinsäureduplexe aus Sonde- und Probemolekülen mittels der Markierung quantifiziert.

Bei der reversen Southern-Hybridisierung, die Grundlage für die hoch parallele Nukleinsäureanalyse auf miniaturisierten Sondenanordnungen (DNA microarrays) ist, werden die Sondenmoleküle auf der Oberfläche gebunden und markierte Probemoleküle in freier Lösung zugegeben.

ELISA und Southern-Hybridisierung haben gemeinsam, daß das Bindeereignis durch eine Markierung nachgewiesen wird und daß einer der Bindepartner auf einer Oberfläche gebunden wird. Eine weitere Eigenschaft, die sie mit allen gängigen Bindetests gemeinsam haben, besteht darin, daß man Bindeeigenschaften zweier Bindungspartner zueinander auf der Basis der Größe der Bindungsenergie im resultierenden Bindungskomplex charakterisiert.

Ein analytisches Verfahren, bei dem auch eine Kraftkomponente zum Einsatz kommt, wird durch WO99/45142 beschrieben. Hier kommt es zur Trennung eines Nukleinsäurekomplexes, sobald dieser durch die Anlagerung einer Probesubstanz mit einer Zugkraft verbunden wird.

Die Trennung dieses Komplexes führt zu einem Fluoreszenzsignal durch die räumliche Trennung zweier Fluorophore.

Dabei ist es nicht vorgesehen, daß sich statt des Nukleinsäureduplexes auch der Bindungskomplex der Probesubstanz trennen könnte. Es findet also kein Kraftvergleich zwischen den Bindungskräften zweier Bindungskomplexe statt. Vielmehr kann bei WO99/45142 nur die An- und Abwesenheit eines Analyten bestimmt werden.

Bei WO99/45142 wurde nicht erkannt, daß die Größe der Bindekraft zwischen der Probesubstanz und einem Rezeptor eine wertvolle analytische Information darstellt, noch wurde ein Mittel beschrieben um diese zu bestimmen.

#### Modell der molekularen Wechselwirkung

Die chemische Wechselwirkung zwischen zwei Bindungspartnern läßt sich anhand verschiedener Modelle beschreiben. Das klassische theoretische Gerüst ist die Thermodynamik. Für die Entwicklung der Thermodynamik war ausschlaggebend, daß es

lange nicht möglich war, molekulare Wechselwirkungen an einzelnen Molekülen zu messen. Deshalb beschreibt sie die Wechselwirkung von Teilchen auf der Basis makroskopisch meßbarer Größen. Hieraus resultiert das Konzept der Bindungsenergie, die als die zum Lösen einer Bindung erforderliche Energie definiert ist. Die Bindungsenergie zweier Bindungspartner zueinander kann über die Messung der Konzentrationen von freien und gebundenen Bindungspartnern über die Gleichgewichtskonstante abgeleitet werden.

Ein grundlegend anderes Konzept zur Charakterisierung molekularer Wechselwirkung wurde durch die Kraftmessung, z.B. mit dem Atomic Force Microscope, an einzelnen Molekülen ermöglicht. Die Kräfte, die zwischen den Atomen zweier Bindungspartner ausgebildet werden, können experimentell durch die aufzuwendende Trennkraft bestimmt werden. Aus der Ratenabhängigkeit der Trennkräfte kann unter bestimmten Voraussetzungen das Bindungspotential eines Bindungskomplexes rekonstruiert werden. Im Gegensatz zu einer Charakterisierung eines Bindekplexes anhand seiner Bindungsenergien ist der Zerfall des Komplexes bei einer Kraftmessung nicht durch die thermische Anregung, sondern durch einen manipulativen Eingriff bedingt.

Zur Erläuterung des Bindungspotentials wird hier ein stark vereinfachtes Bindungsmodell beschrieben.

Ein Bindungskomplex ist nicht alleine durch seine Bindungsenergie charakterisiert. Er besitzt auch eine für ihn charakteristische Aktivierungsbarriere, welche seine Binde- und Zerfallswahrscheinlichkeit bestimmt. Auch besitzt jeder Bindungskomplex eine definierte räumliche Struktur. Eine diese Struktur beschreibende charakteristische Größe ist die Bindungslänge oder Potentialweite. Diese Größen lassen sich in folgendem einfachen Modell des Bindungspotentials zusammenfassen, das in Figur 1 dargestellt ist.

Im gebundenen Zustand sitzt der Ligand im Minimum des Potentials. Um den Komplex aufzubrechen, muß der Ligand über die Potentialbarriere aus der Bindungstasche bzw. aus dem Bindungspotential herausgezogen werden. Die dazu nötige Kraft ist bestimmt durch die Ableitung des Potentials (Steigung).

Dem mechanischen Aufbrechen ist ein spontaner Zerfall des Komplexes durch thermische Aktivierung überlagert. Dieser spontane Zerfall ist abhängig von der Aktivierungsbarriere  $\Delta G$ . Eine an den Komplex angelegte Kraft erniedrigt die noch zu überwindende

Aktivierungsbarriere. Bei jeder anliegenden Kraft besitzt der Komplex damit eine gewisse Wahrscheinlichkeit, innerhalb einer bestimmten Zeit zu zerfallen. Die Kraft, bei der ein Komplex tatsächlich zerfällt, hängt daher auch davon ab, wie schnell die Kraft angelegt wird. Steigert man die angelegte Kraft kontinuierlich mit einer festen Kraftrate  $r$  bis der Komplex zerfällt, erhält man folgende mittlere Trennkraft für den Komplex in Abhängigkeit von der angelegten Kraftrate:

$$F = \frac{kT}{\Delta x} \cdot \ln \left[ \frac{\Delta x \cdot r}{k_{\text{Zerfall}} \cdot kT} \right]$$

Bestimmt man unter verschiedenen Kraftraten jeweils die mittlere Trennkraft, lässt sich daraus die für den Bindungskomplex charakteristische Bindungsweite  $\Delta x$  und die Zerfallsrate  $k_{\text{Zerfall}}$  des Komplexes bestimmen.

Das Messen von Trennkräften stellt daher einen neuen Zugang zur Charakterisierung von Bindungskomplexen dar.

#### Methoden der molekularen Kraftmessung

Obwohl die große Mehrheit der Bindetests selektive Wechselwirkungen auf der Basis von Bindungsenergien nachweist, gibt es Beispiele für Methoden, die sich die Vorteile der charakteristischen Trennkräfte der Bindungskomplexe zu eigen machen.

Das erste Beispiel für eine solche Vorrichtung ist der "surface force apparatus" (SFA) der 1976 von Israelachvili entwickelt wurde (Patent US5861954, 1999, Israelachvili). Mit diesem Apparat können Adhäsionskräfte zweier Molekülschichten zueinander gemessen werden. Jede der Probesubstanzen wird hierzu auf ein zylindrisch gebogenes Glimmerblättchen aufgebracht, die im Idealfall in nur einem Punkt in Berührung gebracht werden. Durch eine genau kontrollierte Bewegung der Glimmeroberflächen zueinander werden Kräfte zwischen den molekularen Schichten angelegt. Mißt man die Bewegung der Oberflächen zueinander in Abhängigkeit der angelegten Kraft, so erhält man eine Aussage über die Adhäsionskräfte zwischen den beiden molekularen Schichten.

Bei der zweiten Methode zur Messung molekularer Kräfte handelt es sich um das "atomic force microscope" (AFM). Mit dem AFM gelang die erste Bestimmung der Trennkraft einer

schwachen Wechselwirkung eines biologischen Rezeptor-Ligand-Paars, dem Biotin-Streptavidin-System (E.-L. Florin, V.T. Moy and H.E. Gaub, *Science* 264, 415 (1994)). Im Gegensatz zum SFA werden beim AFM keine makroskopischen Oberflächen in Kontakt gebracht. Die Spitze eines AFM ist nur wenige Nanometer groß und kann sich an ihrem Ende im Idealfall auf ein einzelnes Atom zuspitzen. Im Bestfall kann man zwischen einer AFM Spitze und einer zweiten Oberfläche ein einzelnes Molekül, z.B. einen DNA-Doppelstrang, aufhängen. Wird die Spitze nun von der Oberfläche weggezogen, so kommt es zur Spannung des Moleküls und zur Verbiegung des AFM-Cantilevers, die bei bekannter Federkonstante des Cantilevers eine Messung der molekularen Bindekkräfte erlaubt.

Eine Abwandlung der AFM-Methode, die in Richtung diagnostischer Anwendung zielt wird in Patent US5992226; Lee et al. beschrieben. Hier ist die Probe statt auf einer flachen Oberfläche zwischen einem spitz auslaufenden Vorsprung und der AFM-Spitze gebunden.

Eine dritte Methode zur Charakterisierung molekularer Kräfte basiert auf der Verwendung mikroskopisch kleiner magnetischer Kugeln. Man bindet einen Rezeptor auf einer magnetischen Kugel und läßt diesen mit einem Liganden, der wiederum an einer Oberfläche gebunden ist, einen Bindungskomplex bilden. Setzt man die Magnetkugel einem definierten magnetischen Feld aus, so kann man eine definierte Zugkraft an den Bindungskomplex zwischen Kugel und Oberfläche anlegen. Beobachtet man die Position der Magnetkugel in Richtung der Zugkraft, während man diese variiert, bis es zur Trennung des Bindungskomplexes kommt, so kann man die Trennkraft bestimmen, die benötigt wird, um Rezeptor und Ligand auseinanderzureißen.

Der Nachweis von Trennkräften mit Magnetkugeln leitet sich von einem immunologischen Sandwichtest ab, bei dem die Kräfte nur zur Separation von ungebundenen und gebundenem Ligand eingesetzt werden (Patente US5445970 und US5445971, 1995, Rohr). Ein weitergehender Ansatz sieht eine Feinabstimmung der Zugkräfte vor, so daß prinzipiell schwache spezifische Bindungen eines Antigens zu einem Antikörper von starken Unterschieden werden können (Patent WO9936577, 1999, Lee).

Bei der vierten Methode handelt es sich um eine Kraftmessung mit "optischen Pinzetten" (Optical Tweezers). Die Grundlagen dieser Technik gehen auf Arthur Ashkin zurück. Die Ausübung der Zugkraft wird hier durch die Bewegung eines stark fokussierten Laserstrahls ausgeübt, der einen mikroskopischen Partikel einfangen und bewegen kann.

Eine Anwendung der Optical Tweezers zur Kraftmessung für diagnostische Zwecke wurde durch Kishore beschrieben. (Patent US5620857, 1997, Kishore et al.)

Die fünfte Methode beruht auf der Adhäsion eines elastischen Stempels (Conformal Pillar), der mit einer Probesubstanz beschichtet ist zu einer Oberfläche, die mit einer Sonde beschichtet ist. Beim Wieder-Ablösen des Stempels von der Oberfläche können Trennkräfte gemessen werden, die der Identifikation der Probe dienen (Patent EP0962759; 1999, Delamarche et al.). Bindungskomplexe anhand von Trennkräften statt anhand von Bindungsenergien zu charakterisieren bringt einige bedeutende Vorteile. Über die Potentialweite der Bindung erhält man einen neuen unabhängigen Parameter zur Charakterisierung der Bindung, der es erlaubt, verschiedene Bindungsmodi, die gleiche Bindungsenergien besitzen voneinander zu unterscheiden. Dies gilt insbesondere für die Unterscheidung von unspezifischen und spezifischen Bindungen bei Proteinen, sowie für die Diskriminierung zwischen Nukleinsäureduplexen, die vollständig komplementär sind bzw. Fehlpaarungen aufweisen.

Eine Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist, ein Verfahren und eine Vorrichtung bereitzustellen, das bzw. die einen einfachen Test ermöglicht.

Diese Aufgabe wird mit den Merkmalen der Patentansprüche gelöst.

Ein weiteres Ziel der vorliegenden Erfindung ist es, die beschriebenen Vorteile von Bindetests, die auf der Unterscheidung von Trennkräften beruhen für ein breites Anwendungsfeld und die kommerzielle Nutzung zugänglich zu machen, was durch den bisherigen Stand der Technik nicht möglich war.

Die Erfindung hat Vorteile gegenüber herkömmlichen Kraftdiskriminierungsmethoden. Die herkömmlichen Methoden der molekularen Kraftmessung sind Weiterentwicklungen von Methoden, die ursprünglich einem völlig anderen Zweck dienten. Der SFA wurde für Oberflächenkräfte, AFM für die Abbildung von Oberflächen, Magnetkugeln für die Separation von Molekülen und die Conformal Pillar Methode als präparative Methode zum Strukturieren von Oberflächen entwickelt.

Ein weiteres Ziel der vorliegenden Erfindung ist einen Krafttest bereitzustellen, der

Bindeneigenschaften eines Bindungskomplexes durch simultanes Testen vieler nicht kooperativer Einzelereignisse testen kann.

Bei Methoden mit magnetischen Kugeln (magnetic beads) erhält man i.d.R. Trennkräfte, die auf mehreren kooperativen Ereignissen beruhen, da mehrere Bindungskomplexe an einer Kugel befestigt werden.

Ein weiteres Ziel der vorliegenden Erfindung ist ein Krafttest, bei dem die Trennung des Bindungskomplexes und die Detektion des Ergebnisses zeitlich getrennt sind (einmalig). Dies resultiert in einem einfachen apparativen Aufbau und einer hohen Flexibilität bei der Auswahl der Detektionsmethode.

Ein weiteres Ziel der vorliegenden Erfindung ist ein Krafttest, der keinen komplexen apparativen Aufbau erfordert und dessen Durchführung keine Experten erfordert.

Ein weiteres Ziel der vorliegenden Erfindung ist ein Krafttest, der eine hohe parallele Messung vieler verschiedener Proben ermöglicht.

Ein weiteres Ziel der vorliegenden Erfindung ist ein Krafttest, bei dem Zugkräfte realisierbar sind, die weit über dem der Optical Tweezers und dem der magnetischen Kugeln liegen.

Ein weiteres Ziel der vorliegenden Erfindung ist eine schnellere Bindungskinetik der Bindepartner bereitzustellen, als sie bei einem Verfahren wie dem ELISA möglich ist, bei dem die Kinetik durch die Diffusionsgeschwindigkeit der in freier Lösung befindlichen Reaktionspartner limitiert ist.

Im Gegensatz zu den beschriebenen Methoden basiert die vorliegende Erfindung auf einer Technik, die von Anfang an für die Bestimmung von Bindungspotentialen konzeptioniert wurde, und die gegenüber dem Stand der Technik bedeutende Vorteile bietet.

Der Surface Force Apparatus von Israelachvili ist nicht für die Analyse von Biomolekülen geeignet. Der apparative Aufbau ist ausgesprochen komplex und teuer und schon deshalb für diagnostische Anwendungen kaum geeignet. Eine parallele Messung verschiedener Substanzen ist nicht beschrieben und dürfte nur schwer zu verwirklichen sein.

Der Hauptvorteil des Atomic force Microscope ist seine hohe Kraftauflösung. Der komplexe

apparative Aufbau führt jedoch zu hohen Anschaffungskosten und auch die Handhabung, die einen Experten erfordert, macht dieses Gerät ungeeignet für eine Nutzung außerhalb der Grundlagenforschung. Eine weitere Einschränkung besteht darin, dass ein statistisch gesichertes Meßergebnis eine Vielzahl von sequentiellen Experimenten erfordert und deshalb mit einem großen Zeitaufwand verbunden ist. Auch hinsichtlich einer der wichtigsten Anforderungen an ein diagnostisches Meßverfahren, der parallelen Messung vieler verschiedener Probesubstanzen, hat das AFM einen inhärenten Nachteil.

Der Einsatz von magnetischen Kugeln ist problematisch hinsichtlich der Ausübung von Kräften. Praktikable Partikelgrößen und Feldstärken erlauben keine Kräfte, die imstande wären, einen DNA-Duplex auseinander zu ziehen, was diese Methode von dem Einsatz in der molekularen Diagnostik ausschließt. Die selbe Problematik gilt für die Verwendung von Optical Tweezers. Die realisierbaren Zugkräfte liegen hier deutlich unter 100pN und sind somit viel zu gering, um einen DNA-Duplex testen zu können.

Die vorliegende Erfindung kann die folgenden vorteilhaften Eigenschaften aufweisen:

- Ein einfacher und günstiger apparativer Aufbau
- Eine einfache Handhabung
- Eine hohe Kraftauflösung bei simultaner Messung einer Vielzahl von Bindeereignissen
- Nicht limitierte Zugkraft
- Nicht kooperatives simultanes Testen vieler Bindungskomplexe

Die Möglichkeit, viele gleichartige Probenkomplexe während eines Meßvorganges gleichzeitig zu testen, wobei das Ergebnis für jeden Komplex unabhängig von den anderen Komplexen ausfällt, also nicht-kooperativ ist, ist als einer der Hauptvorteile der Erfindung anzusehen. Bei den beschriebenen Methoden mit dem conformal pillar oder mit magnetischen Kugeln handelt es sich stets um kooperative Ereignisse, da eine Trennung einiger der Komplexe sich auf die Trennwahrscheinlichkeit der verbleibenden Komplexe auswirkt. Die Information über die Einzelereignisse geht dabei verloren.

Die zur Beschreibung der Erfindung verwendeten Begriffe werden folgendermaßen definiert:

Aufhängung: Verbindung eines Bindungspartners mit einer Halteeinrichtung.

Bindeeigenschaften: Verhältnis zweier Bindungspartner zueinander wie: keine Bindung; Bindungsaffinität; Bindungsmodus.

Bindungskomplex: Komplex aus mehreren Bindepartnern; Molekülen oder Körpern oder Körpern und Molekülen, die miteinander in Wechselwirkungen stehen und die durch eine Zugkraft getrennt werden können.

Bindungspartner: Bestandteil eines Bindungskomplexes, der durch Zugkräfte von einem anderen Bindungspartner getrennt werden kann. Bindungspartner können spezifisch oder unspezifisch miteinander wechselwirken. Die Wechselwirkung ist nicht-kovalent.

Biomoleküle: Moleküle, die aus biologischen Systemen gewonnen werden bzw. künstliche Moleküle, die solchen aus biologischen Systemen gleichen.

Konjugat: Verbindung von zwei Bindungspartnern.

Verbindung: Verbindungselement eines Konjugats.

Referenzkomplex: Bindungskomplex mit einer Trennkraft als Bezugswert bzw. einer bekannten Trennkraft.

Ligand: Einer der Bindungspartner eines spezifischen Bindungskomplexes.

Mittlere Trennkraft: Arithmetisches Mittel der Trennkräfte mehrerer gleichartiger Bindungskomplexe, deren individuelle Trennkraft aufgrund der thermischen Anregung variiert.

Probe (target): Molekül, Polymer, usw. das einen Probenkomplex ausbilden kann.

Probenkomplex: Bindungskomplex, der zu charakterisieren/nachzuweisen ist. Entweder handelt es sich um zwei bekannte Bindungspartner, deren Bindungseigenschaften bestimmt werden sollen oder es handelt sich um einen bekannten Bindungspartner. Es kann sich um eine unbekannte oder eine bekannte Trennkraft handeln.

Rezeptor: Einer der Bindungspartner eines spezifischen Bindungskomplexes.

Separation: Bindungspartner, die keinen Bindungskomplex eingegangen sind, von solchen absondern, die einen Bindungskomplex eingegangen sind.

Spezifische Wechselwirkung: Molekulare Wechselwirkung zwischen zwei Bindungspartnern eines Bindungskomplexes, die sich durch ein hohes Maß an molekularer Erkennung auszeichnet.

Trennkraft (unbinding force): maximal nötige Kraft, um einen Bindungskomplex mechanisch zu trennen.

Verkettung: Anordnung eines ersten Bindungspartners, der an einen zweiten Bindungspartner eines Konjugats bindet und eines dritten Bindungspartners, der Bestandteil des Konjugats ist und der einen vierten Bindungspartner bindet.

Kopplung: Verbindung der beiden Halteeinrichtungen über eine Verkettung.

Kopplungspartner: zwei Elemente, die aneinander binden und auf diese Weise eine Kopplung bewirken.

Halteeinrichtung: Mittel, über das eine Kraft an die Verkettung angelegt werden kann.

Kopplungszahl: Anzahl der tatsächlich erfolgten Kopplungen bei einem Versuchsdurchgang.

Kopplungseffizienz: Der Quotient aus der Anzahl der tatsächlich erfolgten Kopplungen (Kopplungszahl) und der Anzahl der maximal möglichen Kopplungen:

$$\text{Kopplungseffizienz} = \frac{\text{Kopplungszahl}}{\text{maximal mögliche Kopplungen}}$$

Die Erfindung wird nachstehend anhand von Beispielen und der Zeichnungen näher erläutert.  
Es zeigen

Fig. 1 ein vereinfachtes Bindungspotential eines Bindungskomplexes,

Fig. 2 das Prinzip des differentiellen Krafttest. Nach der Ausübung einer Zugkraft auf das Konjugat aus B1 und B2, kommt es zum Zerreißen von B1 falls  $F_1 < F_2$  oder zum Zerreißen von B2 falls  $F_1 > F_2$ ,

Fig. 3 die Unterscheidung zwischen unspezifischen Wechselwirkungen mit einem Körper und spezifischen Wechselwirkungen mit einem Bindungspartner,

Fig. 4 die Unterscheidung eines vollständig gepaarten Nukleinsäureduplexes von einem unvollständig gepaarten,

Fig. 5 die simultane Ausführung eines vergleichenden Krafttests an fünf unabhängigen, gleichartigen Bindungskomplexen im Sandwichformat. Die Probe verfügt in diesem Fall über die Bindungspartner BP2 und BP3. Die Probe ist mit einer Markierung versehen. Da  $F_1 > F_2$  ist, zerreißen überwiegend die Bindungskomplexe B2, und

Fig. 6 die simultane Ausführung eines vergleichenden Krafttests an fünf unabhängigen, gleichartigen Bindungskomplexen im Captureformat. Die Probe verfügt in diesem Fall über den Bindungspartner BP1 und ist an die Oberfläche 1 gebunden. Das Konjugat aus BP2 und BP3 ist mit einer Markierung versehen. Da  $F_1 > F_2$  ist, zerreißen überwiegend die Bindungskomplexe B2.

Fig. 7 zeigt eine mögliche Ausführungsform eines Stempelapparates, der zur Durchführung des erfindungsgemäßen Verfahrens geeignet ist. Eine genauere Beschreibung einer möglichen Ausführungsform findet sich im Experimentellen Beispiel 1.

Fig. 8 zeigt Darstellungen einer Unterlage (8A) und eines Stempels (8B) nach einem Krafttest zum Vergleich der Komplexe Biotin/Streptavidin und Iminobiotin/Streptavidin (siehe Experimentelles Beispiel 1).

Fig. 9 zeigt Darstellungen je einer Unterlage (9A und 9C) und eines Stempels (9B und 9D) nach Krafttests zum Vergleich zweier DNA-Duplexe (siehe Experimentelles Beispiel 2). Fig. 9A zeigt die Unterlage bei Experiment 2a, Fig. 9B zeigt den Stempel bei Experiment 2a, Fig. 9C zeigt die Unterlage bei Experiment 2b, Fig. 9D zeigt den Stempel bei Experiment 2b.

Fig. 10 zeigt die Ergebnisse der Auswertung von Unterlage und Stempel nach einem Kraftvergleich, wobei ein DNA-Duplex mit einem identischen Duplex (10C und D) und einem weiteren Duplex (10A und B) verglichen wurde (siehe Experimentelles Beispiel 2). 10A: Unterlage bei Experiment 2a; 10B: Stempel bei Experiment 2a; 10C: Unterlage bei Experiment 2b; 10D: Stempel bei Experiment 2b. Es handelt sich jeweils um Ausschnitte von Fluoreszenzprofilen.

Fig. 11 zeigt schematisch die Verteilung des Konjugates bei vollständiger (A) bzw. teilweiser (B und C) Kopplung.

Fig. 12 zeigt das Prinzip des reversen Stempelns. A und C zeigen jeweils die zusammengeführten Oberflächen während des Stempelns, wobei die markierte Probe einmal auf der linken Seite (A) und einmal auf der rechten Seite (B) angebunden wurde. Die mit "X" gekennzeichneten Bindungspartner bilden bei einer Kopplungseffizienz von 2/3 keine

Bindung zur jeweils anderen Oberfläche aus. Sie gehen damit auch nicht in die Verteilung zwischen den Oberflächen beim Trennen ein.

Fig. 13 zeigt Beispiele für Messergebnisse zum reversen Stempeln des Streptavidins von Biotin auf Desthiobiotin und umgekehrt.

Fig. 14 zeigt unterschiedliche Arten, auf die Kopplung erfolgen kann.

1. Erster Bindungspartner BP1
2. Zweiter Bindungspartner BP2
3. Dritter Bindungspartner BP3
4. Vierter Bindungspartner BP4
5. Bindungskomplex 1 (B1)
6. Bindungskomplex 2 (B2)
7. Verkettung
8. Konjugat des zweiten Bindungspartners BP2 und des dritten Bindungspartners BP3
9. Aufhängung des ersten Bindungspartners BP1
10. Aufhängung des vierten Bindungspartners BP4
11. Verbindung des zweiten Bindungspartners BP2 und des dritten Bindungspartners BP3
12. Vektor der Ziehgeschwindigkeit
13. Oberfläche 1
14. Oberfläche 2
15. Probe
16. Probe mit dem zweiten Bindungspartner BP2 und dem dritten Bindungspartner BP3
17. Aufhängung der Probe
18. Markierung

Bei der vorliegenden Erfindung handelt es sich um eine Methode und eine Vorrichtung zur Durchführung dieser Methode, die gegenüber den herkömmlichen Krafttests ein gänzlich

unterschiedliches Prinzip der Bestimmung von Trennkräften aufweist.

Ein differentieller Krafttest besteht aus zwei Bindungskomplexen, die miteinander verkettet sind. Beim Anlegen einer Kraft, die mindestens über der Trennkraft eines der beiden Bindungskomplexe liegt, kommt es zum Zerreißen eines der beiden Bindungskomplexe. Der Bindungskomplex mit der höheren Trennkraft bleibt dabei intakt. Kennt man die Trennkraft eines der beiden Bindungskomplexe, so kann man auf diese Weise darauf schließen, ob die Trennkraft des zweiten Bindungskomplexes größer oder kleiner als die des ersten ist. Der differentielle Krafttest kann für eine Vielzahl von diagnostischen Anwendungen verwendet werden. Die Erfindung eignet sich insbesondere als Methode zum diagnostischen Nachweis oder zur Charakterisierung der Bindeeigenschaften von biochemischen Molekülen bzw. Molekülen mit einem hohen Grad an spezifischer molekularer Erkennung.

Bei der vorliegenden Erfindung erfolgt die Charakterisierung von Bindeeigenschaften von Bindungspartnern auf Basis der Trennkraft, die für das Trennen ihres Bindungskomplexes notwendig ist.

Der erfindungsgemäße differentielle Krafttest kann an einer einzigen Verkettung vorgenommen werden. Bevorzugt ist es aber, daß in einem Krafttest mehrere gleichartige Verkettungen eingesetzt werden. Wenn in der vorliegenden Anmeldung bestimmte Bestandteile der Verkettung und/oder Verfahrensschritte im Singular genannt werden (z. B. Bindungspartner, Bindungskomplex, Konjugat, Verkettung, Kopplungspartner, Probe usw.), so bedeutet dies nicht, daß die Erfindung auf Krafttests an einzelnen Verkettungen beschränkt ist. Vielmehr werden dadurch auch Krafttests mit mehreren Verkettungen umfasst. Die Verwendung des Singulars dient lediglich einer verbesserten Anschaulichkeit der Darstellung. Dem Fachmann ist bekannt, daß ein Test in der Praxis in der Regel an vielen Molekülen, Bindungspartnern, Komplexen usw. durchgeführt wird.

Die Charakterisierung der Trennkraft  $F_1$ , die für die Trennung eines Bindungskomplexes B1 (5) aufgewendet werden muß, erfolgt durch den Vergleich mit der Referenz-Trennkraft  $F_2$ , die zur Trennung eines zweiten Bindungskomplexes B2 (6) aufgewendet werden muß. Beide Bindungskomplexe sind zu einer Verkettung verbunden, an deren beiden Seiten man eine Zugkraft anlegt. Von Kopplung spricht man, wenn eine Verkettung zwei Halteeinrichtungen verbindet, über die eine Kraft angelegt werden kann. Hervorzuheben ist, daß die Zugkraft auf die beiden seriell angeordneten Bindungskomplexe gleich groß ist. Überschreitet die Zugkraft einen Wert, der über dem einer der Trennkräfte ( $F_1$  oder  $F_2$ ) liegt, so kommt es zur Trennung

der Bindungspartner desjenigen Bindungskomplexes, dessen Trennkraft geringer ist. Kommt es z.B. zur Trennung des Bindungskomplexes B1, so folgt daraus, daß  $F_1 < F_2$  war. Wurde B2 getrennt, so folgt daß  $F_1 > F_2$  war. Figur 2 zeigt das Prinzip des Krafttests.

Bei dem Bindungskomplex B1 (5) handelt es sich in der Regel um einen Probenkomplex, d.h. einen Bindungskomplex, dessen Bindungseigenschaften charakterisiert werden sollen oder bei dem ein Bindungspartner über eine bekannte Bindeeigenschaft mit einem anderen Bindungspartner nachgewiesen werden soll. Es kann sich jedoch auch um eine undefinierte, unspezifische Wechselwirkung zwischen zwei Bindungspartnern oder zwischen einem Bindungspartner und einem Körper handeln.

Bei B2 (6) handelt es sich i.d.R. um einen Referenzkomplex, d.h. um einen Bindungskomplex, dessen Bindungseigenschaften eine Größe, insbesondere eine Trennkraft vorgeben, mit der der Probenkomplex verglichen wird.

Üblicherweise umfasst der Probenkomplex den ersten Bindungspartner BP1 und den zweiten Bindungspartner BP2, der Referenzkomplex den dritten Bindungspartner BP3 und den vierten Bindungspartner BP4. Gemäß der vorliegenden Erfindung kann aber auch der Probenkomplex den dritten Bindungspartner BP3 und den vierten Bindungspartner BP4, der Referenzkomplex den ersten Bindungspartner BP1 und den zweiten Bindungspartner BP2 umfassen.

Bei dem vorhergehend beschriebenen Prinzip handelt es sich nicht um eine "Messung" im engeren Sinne, sondern vielmehr um ein "Lehren". Nach der Deutschen Industrienorm beschreibt der Begriff "Lehren" ein Prüfverfahren, bei dem der zu prüfende Gegenstand mit einer bekannten Größe eines anderen Gegenstandes verglichen wird. In diesem Sinne wird auch bei der vorliegenden Erfindung die Trennkraft des Bindungskomplexes B1 mit einer zweiten bekannten Trennkraft verglichen. Beim "Messen" handelt es sich hingegen um ein Prüfverfahren, bei dem die zu bestimmende Größe einen konkreten Zahlenwert auf der Meßskala ergibt. Dies entspricht dem Sachverhalt einer Kraftmessung mit dem AFM oder mit einer der anderen Methoden des Standes der Technik.

Die Besonderheit der vorliegenden Erfindung liegt darin, daß jedem zu testenden Probenkomplex eine Kraftlehre im nanoskopischen Maßstab, der Referenzkomplex, zugeordnet ist. Jeder Probenkomplex wird unabhängig getestet, das Ergebnis vieler Einzeltests ergibt schließlich das Meßergebnis. Eine Besonderheit, die aus diesem Prinzip folgt, ist die Möglichkeit die Trennung der Bindungskomplexe und die Detektion zeitlich

getrennt ausführen zu können.

Die Erfindung berücksichtigt insbesondere die thermische Anregung. Aus dem anfangs erörterten Modell der molekularen Wechselwirkung (Fig. 1) ist es ersichtlich, daß die Trennkraft, die benötigt wird, um den Bindungskomplex B1 bzw. einen weiteren Bindungskomplex B2 zu trennen, variiert, da die Wechselwirkung zwischen den Bindungspartnern einer thermischen Anregung unterliegt. Deshalb wird gemäß der vorliegenden Erfindung der Vergleich der beiden Bindungspaare vorzugsweise mehrere Male durchgeführt, um einen statistisch gesicherten Mittelwert, die mittlere Trennkraft, bilden zu können, der besagt, ob  $F_1 > F_2$  oder  $F_1 < F_2$  ist. Dies geschieht, indem man viele gleichartige Bindungskomplexe gleichzeitig der gleichen Trennkraft aussetzt und bestimmt, wieviele der Bindungskomplexe B1 und wieviele der Bindungskomplexe B2 getrennt wurden.

Die Erfindung berücksichtigt zusätzlich oder alternativ die Krafratenabhängigkeit. Ein wichtiger Parameter für die Ausführung eines differentiellen Krafttests ist die Rate der angelegten Zugkraft, da die Trennkräfte  $F_1$  und  $F_2$  bei verschiedenen Krafraten stark variieren können. Um einen differentiellen Krafttest nach dem oben beschriebenen Prinzip reproduzierbar wiederholen zu können, kann es ausschlaggebend sein, mit nur einer bestimmten Krafrate zu arbeiten.

Die Krafrate ist bestimmt durch die Geschwindigkeit der Zugkraft und die Elastizität des Konjugats der beiden Bindungskomplexe samt der Aufhängung des ersten Bindungspartners BP1 und des vierten Bindungspartners BP4.

Je nach Anwendung des differentiellen Krafttests kann man die Krafrate auch bewußt variieren, um eine bestimmte Information über einen Bindungskomplex zu erhalten.

Die Erfindung berücksichtigt in einer bevorzugten Ausführungsform die Anzahl an Kopplungen bzw. die Effizienz, mit der eine Verkettung bestehend aus den Bindungspartnern BP1, BP2, BP3 und BP4 zwischen die beiden Halteeinrichtungen gekoppelt wird. Besonders beim Vergleich zweier ähnlich großer Trennkräfte ist es vorteilhaft, die Kopplungszahl und/oder die Kopplungseffizienz in die Auswertung des Versuchs mit einzubeziehen, um das tatsächliche Verhältnis der Trennkräfte ermitteln zu können.

#### Anwendungsbeispiele für die Erfindung

##### 1. Unterscheidung von Bindungsmodi

### 1.1. Unterscheidung von spezifischen und unspezifischen Wechselwirkungen

Ein zentrales Problem von Bindetests, bei denen ein erster Bindungspartner auf einer Oberfläche immobilisiert wird, ist das unspezifische Hintergrundsignal. Das unspezifische Hintergrundsignal wird durch Moleküle eines zweiten Bindungspartners verursacht, die in freier Lösung zugegeben wurden und unspezifisch an die Oberfläche gebunden haben. Es kommt somit zu einer Überlagerung des spezifischen Signals, also des Signals derjenigen Moleküle des zweiten Bindepartners, die spezifisch an den ersten Bindungspartner gebunden haben. Da unspezifische und spezifische Wechselwirkungen mit ähnlich großen Bindungsenergien binden können, ist es schwierig, sie durch einen Bindetest, der auf der Diskriminierung von Bindeenergien beruht, zu unterscheiden.

Figur 3 zeigt einen differentiellen Krafttest zur Unterscheidung von unspezifischer und spezifischer Bindung. Das Konjugat aus BP2 und BP3 bindet unspezifisch an der Oberfläche und spezifisch mit dem an der Oberfläche immobilisierten Bindungspartner BP1, mit dem er den Bindungskomplex B1 ausbildet. BP4 bildet mit BP3 einen Bindungskomplex B2. Für eine bestimmte Kraftrate ist die Trennkraft  $F_2$  des Bindepaares B2 größer als die Trennkraft der unspezifischen Bindung des Bindepartners BP2 zur Oberfläche. Die spezifische Trennkraft  $F_1$  von BP2 und BP1 ist jedoch größer als  $F_2$ . Nach dem Anlegen der Zugkraft kommt es deshalb zur Abtrennung des unspezifisch gebundenen Konjugats, jedoch nicht des spezifisch gebundenen.

### 1.2. Unterscheidung schwächerer spezifischer Bindungen von stärkeren spezifischen Bindungen am Beispiel: Unterscheidung einer Einzelbasenfehlpaarung in einem Nukleinsäureduplex von einer vollständigen Paarung.

Ein wesentliches Problem bei der Unterscheidung von Nukleinsäuresequenzvarianten durch eine reverse Southern-Hybridisierung besteht darin, Nukleinsäureprobemoleküle, die an die immobilisierte Sonde gebunden haben, dahingehend zu unterscheiden, ob sie vollständig komplementär gebunden haben oder eine Einzelbasenfehlpaarung aufweisen. Bei einem Test mit nur einer bestimmten Sonde von ca. 15-25 Basenpaaren können Einzelbasenfehlpaarungen von vollständigen Paarungen auch aufgrund der Bindungsenergien unterschieden werden. Hierzu führt man die Hybridisierung nahe der Schmelztemperatur des vollständig gepaarten Komplexes durch. Unter diesen Bedingungen ist die Fehlpaarung

instabil. Bei einer Anordnung mehrerer Sonden verschiedener Sequenz, wie es bei einer reversen Hybridisierung meist der Fall ist, besteht diese Möglichkeit jedoch nicht.

Figur 4 zeigt eine Unterscheidung einer vollständigen Basenpaarung von einer Einzelbasenfehlpaarung.

Die Ausführungen der Erfindung erfolgt mit folgenden Mitteln:

### 1. Ausübung von Kräften

Das Ausüben von Zugkräften auf die Verkettung kann auf sehr unterschiedliche Weise bewerkstelligt werden, wobei es nicht darauf ankommt, von welcher Natur die angelegte Kraft ist.

Bei der bevorzugten Ausführungsform handelt es sich bei der Zugkraft um einen mechanischen, makroskopischen Zug. Hierzu wird die Verkettung zwischen zwei Körpern befestigt und diese voneinander weg bewegt, bis es zur Trennung eines der beiden Komplexe kommt. Die Körper können nanoskopisch klein sein, es kann sich jedoch ebenso um makroskopisch große Oberflächen handeln.

Im zweiten Fall werden die Zugkräfte durch magnetische Partikel hervorgerufen, die an der Verkettung befestigt sind und auf die ein magnetisches Feld einwirkt. Es kann sich um zwei verschiedene Partikel handeln, die je an einem Ende der Verkettung befestigt sind und die in einem Fall diamagnetisch im anderen Fall paramagnetische Eigenschaften haben.

In einem dritten Fall nutzt man die Möglichkeit, die Verkettung mit großen Molekülen oder Polymeren zu verbinden und mittels deren Widerstand in einem Flüssigkeitsstrom Zugkräfte aufzubauen. Dynamische Zugkräfte lassen sich aufbauen, wenn die Verkettung zwischen Partikel gebunden wird, in die sich Schallwellen, insbesondere Ultraschall, einkoppeln lassen.

In einem vierten Fall nutzt man den Einfluß eines elektrischen Feldes auf geladene Moleküle, wie dies etwa bei einem elektrophoretischen Verfahren der Fall ist. Die Verkettung wird hierzu zumindest an einem Ende mit einem geladenen Molekül, vorzugsweise einem vielfach geladenen Polymer verbunden. Werden beide Enden mit einem geladenen Molekül verknüpft, so handelt es sich um gegensätzlich geladene Moleküle.

In einem fünften Fall erfolgt das Aufbringen der Kraft durch eine Verkürzung eines Polymers, das die Aufhängungen der Bindungspartner BP1 und BP2 bzw. der Verbindung zwischen BP2 und BP3 bildet. Die Verkürzung beruht dabei auf einer Konformationsänderung des Polymers, die durch eine Veränderung des chemischen Milieus, z.B. den pH-Wert oder einer Salzkonzentration verursacht wird.

## 2. Variation der Kraftrate

Die Kraftrate, mit der an einem Molekül gezogen wird, wird durch zwei Parameter bestimmt. Zum einen ist es die Federkonstante der Aufhängungen der Bindungspartner BP1 und BP4 bzw. die Federkonstante der Verbindung zwischen BP2 und BP3, zum zweiten ist es die Ziehgeschwindigkeit. Um die Kraftrate zu variieren, wählt man entweder eine andere Federkonstante oder eine andere Ziehgeschwindigkeit.

Die bevorzugte Ausführung zur Variation der Federkonstante einer Aufhängung oder eines Konjugats erfolgt durch die Variation der Länge eines Polymers, das die Aufhängung bzw. die Verbindung bildet.

## 3. Detektion

Die Detektion hat den Zweck zu bestimmen, welcher der beiden Bindungskomplexe einer Verkettung nach dem Anlegen einer Zugkraft getrennt wurde. Dies kann indirekt oder direkt geschehen.

Ein indirekter Nachweis richtet sich auf einen freien Bindungspartner BP, der vor dem Anlegen der Zugkraft Teil eines Bindungskomplexes B war. Dies erreicht man durch Zugabe einer Sonde, die gegen den freien Bindungspartner gerichtet ist. Kommt es z.B. zur Trennung des Bindungskomplexes B1, so können BP1 oder/und BP2 nachgewiesen werden.

Beim direkten Nachweis weist man nach, in welche der beiden Zugrichtungen das Konjugat der Bindungspartner BP3 und BP2 nach dem Zerreißen hin verlagert wurde. Zu diesem Zweck wird das Konjugat aus BP3 und BP2 mit einer Markierung versehen. Die Bestimmung, welcher der beiden Komplexe getrennt wurde, kann dadurch erfolgen, dass man die Menge an Konjugat aus BP2 und BP3 bestimmt, die sich nach dem Aufbringen der Kraft und nach dem Trennen auf einer der Oberflächen oder Halteeinrichtungen befindet. Die Bestimmung kann

auch dadurch erfolgen, dass man die Menge an Konjugat aus BP2 und BP3 bestimmt, die sich nach dem Aufbringen der Kraft und nach dem Trennen auf der ersten Halteeinrichtungen befindet und die Menge an Konjugat aus BP2 und BP3 bestimmt, die sich nach dem Aufbringen der Kraft und nach dem Trennen auf der zweiten Halteeinrichtungen befindet.

Zum Nachweis der Sonde der indirekten oder der Markierung der direkten Detektion können verschiedenste Methoden des Standes der Technik herangezogen werden. Bei der bevorzugten Ausführungsform handelt es sich bei der Markierung um ein fluoreszierendes Molekül. Hier kann auch FRET (Fluorescence Resonance Energy Transfer) zum Einsatz kommen, indem man die beiden Bindungspartner eines Bindungskomplexes mit zwei verschiedenen Fluorophoren versieht, zwischen denen ein Resonanztransfer stattfindet. Bei der Trennung der beiden Fluorophore geht das Fluoreszenzsignal verloren. Eine weitere Abwandlung besteht darin, einen der beiden Bindungspartner eines Bindungskomplexes mit einem Fluorophor zu versehen, den anderen mit einem Molekül, das die Fluoreszenz des Fluorophors auslöscht (quenching). Beim Trennen der Bindungspartner wird die Auslöschung des Fluorophors aufgehoben, es kommt also zu einer Verstärkung des Signals. Als bevorzugte Fluorophore kommen nanoskalige, kolloidale Halbleiterpartikel (quantum dots) zur Anwendung. Weitere Möglichkeiten sind die radioaktive Markierung, die Markierung mit einem Affinitätsmarker an dem ein Enzym bindet, welches das Signal verstärkt, die Chemolumineszenz, elektrochemische Markierungen oder die Massenspektroskopie.

#### 4. Proben

Der hier beschriebene differentielle Krafttest kann für ein weites Spektrum von Proben eingesetzt werden. Bevorzugt handelt es sich dabei um Proteine, im allgemeinen Antikörper, Antigene, Haptene oder um natürliche und künstliche Nukleinsäuren. Es kann sich jedoch auch um Viren, Phagen, Zellbestandteile oder ganze Zellen handeln. Des weiteren kommen auch komplexbildende Substanzen wie Chelatoren in Betracht.

#### 5. Referenzkomplexe

Ein Bindungspartner eines Referenzkomplexes kann selbst Bestandteil einer Probe sein, wie es beim Sandwichformat der Fall ist. Ein Referenzkomplex kann im Prinzip aus den gleichen Bestandteilen aufgebaut sein, wie ein Probenkomplex.

## 6. Zeitliche Reihenfolge der Verkettung

Die Verbindung der Bindungspartner BP2 (2) und BP3(3) zu einem Konjugat (8) kann erfolgen, bevor es zur Wechselwirkung von BP2 und BP3 mit BP1 oder BP4 kommt. Alternativ kann das Konjugat aus BP2 und BP3 auch erst gebildet werden, nach dem eine Interaktion mit BP1 und BP4 eingetreten ist.

## 7. Kopplung

Unter Kopplung versteht man die Verbindung einer Verkettung mit den beiden Halteinrichtungen. Die beiden an der Kopplung beteiligten Elemente werden als Kopplungspartner (KP1 und KP2) bezeichnet. Bei den Kopplungspartnern kann es sich um Bindungspartner handeln, wie es bei Fall 1 (s.u.) der Fall ist. In anderen Fällen sind die Kopplungspartner jedoch von den Bindungspartnern verschieden (siehe Fall 2 und 3). Die Kopplung soll hier am Beispiel einer bevorzugten Ausführungsform erörtert werden: Bei der Verwendung zweier Oberflächen als Halteinrichtungen, des makroskopischen Zugs zur Ausübung von Kräften und einer Markierung an Bindungspartner 2 oder 3 bzw. am Konjugat kann die Kopplung auf verschiedene Art und Weise erfolgen; Fig. 14 veranschaulicht schematisch die folgenden Fälle:

1. BP1 ist an der ersten Oberfläche gebunden. Das Konjugat aus BP2 und BP3 wird auf der ersten Oberfläche inkubiert, wobei der Komplex B1 aus BP1 und BP2 gebildet wird. Die zweite Oberfläche wird der ersten angenähert, wobei es zur Ausbildung von B2 aus BP3 und BP4 kommt. Durch die Bildung von B2 wird sowohl eine Verkettung der Bindungspartner 1 bis 4 als auch eine Kopplung der Verkettung mit den beiden Oberflächen erreicht. Bei BP3 und BP4 handelt es sich deshalb auch um die Kopplungspartner.
2. BP1 ist an der ersten Oberfläche gebunden. Das Konjugat aus BP2 und BP3 sowie BP4 werden derart auf der ersten Oberfläche inkubiert, daß es zur Ausbildung einer Verkettung kommt. Die zweite Oberfläche wird der ersten angenähert, wobei es zur Bindung von BP4 an die zweite Oberfläche kommt. Bei diesem Schritt kommt es zur Kopplung der auf der ersten Oberfläche bereits vorgebildeten Verkettung. In diesem Fall ist BP4 mit einem Kopplungspartner verbunden, welcher an einen zweiten Kopplungspartner bindet, welcher

auf der zweiten Oberfläche gebunden ist.

3. BP1 ist an der ersten Oberfläche gebunden. BP2 wird auf der ersten Oberfläche inkubiert, wodurch es zur Ausbildung von B1 kommt. BP4 ist auf der zweiten Oberfläche gebunden. BP3 wird auf der zweiten Oberfläche inkubiert, wodurch es zur Ausbildung von B2 kommt. Die zweite Oberfläche wird der ersten angenähert, wobei es zur Bildung des Konjugats aus BP2 und BP3 kommt. Bei diesem Schritt erfolgt sowohl die Bildung der Verkettung als auch die Kopplung der Verkettung an die beiden Oberflächen. In diesem Fall sind BP2 und BP3 jeweils mit einem der Kopplungspartner verbunden.

Idealerweise ließe sich das Verhältnis der Trennkräfte von B1 und B2 direkt aus der Menge an Konjugat, das nach der Durchführung des Tests auf der ersten Oberfläche verblieben ist, und der Menge des Konjugats, das auf die zweite Oberfläche übertragen wurde, bestimmen. In der Praxis werden diese Werte jedoch mehr oder weniger stark verfälscht, wenn es nicht gelingt, annähernd alle vorliegenden markierten Bindungspartner zu koppeln. Fig. 11 zeigt dies anschaulich.

In einem solchen Fall hängt der Übertrag des markierten Konjugats auf die andere Oberfläche sowohl vom Kraftverhältnis von B1 und B2, als auch von der Menge der gekoppelten Verkettungen (Kopplungszahl) ab. Ein geringer Übertrag von z. B. der ersten zur zweiten Oberfläche kann sowohl darauf hindeuten, daß die Trennkraft von B1 größer als die von B2 ist, als auch, daß nur eine geringe Anzahl von Verkettungen an die zweite Oberfläche gekoppelt wurde. Gleichzeitig wird die Menge der auf der ersten Oberfläche verbliebenen, markierten Konjugate durch diejenigen Konjugate erhöht und somit verfälscht, die nicht gekoppelt, d.h. auch keinem Kraftvergleich unterzogen wurden.

Setzt man die Anzahl der tatsächlich erfolgten Kopplungen (Kopplungszahl) mit den maximal möglichen Kopplungen ins Verhältnis, so erhält man die Kopplungseffizienz. Die Zahl der maximal möglichen Kopplungen ist dabei durch die Anzahl desjenigen der beiden Kopplungspartner limitiert, der in der Minderzahl vorliegt. Erfahrungsgemäß kann man daher weiterhin wenigstens ungefähr die Kopplungszahl oder die Kopplungseffizienz, nämlich den Quotienten aus der Anzahl der tatsächlich gebildeten Kopplungen und der Anzahl der maximal möglichen Kopplungen bestimmen, und gegebenenfalls die Kopplungszahl oder die Kopplungseffizienz bei der Bestimmung, ob der Probenkomplex oder der Referenzkomplex getrennt wurde, berücksichtigen.

Um eine nicht-quantitative Kopplung als Fehlerquelle auszuschließen, gibt es verschiedene Vorgehensweisen:

- a) Referenzexperiment mit einem "Selbstvergleich"
- b) "reverse Ausführung" eines Versuchs
- c) "Doppelmarkierung" und Vorbildung der Verkettung auf einer Oberfläche

Der "Selbstvergleich" (a) und die "reverse Ausführung" (b) sollen hier an Fall 1) (s.o.) erörtert werden:

Bei einem "Selbstvergleich" (a) wird neben dem eigentlichen Kraftvergleich noch ein Referenzexperiment durchgeführt. Für den Kraftvergleich inkubiert man das markierte Konjugat mit einem ersten Bindungspartner (z.B. BP1), der auf einer ersten Oberfläche gebunden ist, und bestimmt den Übertrag auf die zweite Oberfläche, die mit einem weiteren Bindungspartner (z.B. BP4) dekoriert ist. Bei dem Kraftvergleich handelt es sich bei BP1 und BP4 um unterschiedliche Bindungspartner, deren Trennkraftverhältnis bestimmt werden soll. Den Referenzversuch führt man in gleicher Weise durch, wobei die Bindungspartner auf beiden Oberflächen dem Bindungspartner BP4 (also des Bindungspartners des Kraftvergleichs auf der zweiten Oberfläche) identisch sind. Bei dem Referenzversuch spricht man von einem "Selbstvergleich", da zwei identische Komplexe verglichen werden.

Um nun eine Aussage treffen zu können, welcher der Bindungskomplexe (B1 bzw. B2) die größere Trennkraft aufweist, müssen zwei Voraussetzungen erfüllt sein: gleiche Kopplungseffizienz für Kraftvergleich und Selbstvergleich und gleiche Dichte aller Bindungspartner, die an die erste Oberfläche gebunden sind bzw. aller Bindungspartner, die an die zweite Oberfläche gebunden sind. Unter diesen Vorbedingungen kann man für B1 (Komplex aus BP1 und BP2) auf eine größere Trennkraft schließen, wenn der Übertrag auf die zweite Oberfläche beim Kraftvergleich geringer ausfällt als beim Referenzexperiment. Fällt der Übertrag hingegen größer aus als beim Referenzexperiment, so weist B2 (Komplex aus BP3 und BP4) die größere Trennkraft auf.

Die Erfindung betrifft demnach auch ein Verfahren, in dem (i) in einem ersten Schritt

(=Kraftvergleich) die Menge an Konjugat umfassend den zweiten Bindungspartner BP2 und den dritten Bindungspartner BP3 bestimmt wird, die nach der Trennung von einer ersten Halteeinrichtung auf eine zweite Halteeinrichtung übertragen wurde, und/oder die Menge an Konjugat umfassend den zweiten Bindungspartner BP2 und den dritten Bindungspartner BP3 bestimmt wird, die nach der Trennung nicht von der ersten Halteeinrichtung auf die zweite Halteeinrichtung übertragen wurde, wobei der erste Bindungspartner BP1 von dem vierten Bindungspartner BP4 verschieden ist und (ii) in einem zweiten Schritt (=Selbstvergleich) zur Bestimmung der Kopplungseffizienz die Menge an Konjugat umfassend den zweiten Bindungspartner BP2 und den dritten Bindungspartner BP3 bestimmt wird, die nach der Trennung von einer ersten Halteeinrichtung auf eine zweite Halteeinrichtung übertragen wurde, und/oder die Menge an Konjugat umfassend den zweiten Bindungspartner BP2 und den dritten Bindungspartner BP3 bestimmt wird, die nach der Trennung nicht von der ersten Halteeinrichtung auf die zweite Halteeinrichtung übertragen wurde, wobei der erste Bindungspartner BP1 auch als vierter Bindungspartner BP4 eingesetzt wird, oder der vierte Bindungspartner BP4 auch als erster Bindungspartner BP1 eingesetzt wird, so dass der erste Bindungspartner BP1 und der vierte Bindungspartner BP4 in dem zweiten Schritt identisch sind, und der zweite Bindungspartner BP2 im wesentlichen identisch mit dem dritten Bindungspartner BP3 ist.

Ein Referenzversuch mit einem Selbstvergleich kann allerdings nur durchgeführt werden, wenn man ein Konjugat mit zwei identischen Bindungspartnern zur Verfügung hat, wie dies in Experimentbeispiel 1 der Fall ist. In andersartigen Fällen muß auf eine der folgenden Lösungen zurück gegriffen werden.

Bei der "reversen Ausführung" (b) eines Versuchs inkubiert man das markierte Konjugat bei einer ersten Durchführung mit BP1, der auf der ersten Oberfläche gebunden ist, und bestimmt den Übertrag auf Oberfläche 2 mit BP4. Bei einer zweiten Durchführung inkubiert man das Konjugat mit BP4 auf der zweiten Oberfläche und bestimmt den Übertrag auf die erste Oberfläche.

Die Erfindung betrifft demnach auch ein Verfahren, in dem in einer ersten Durchführung (i) auf einer ersten Halteeinrichtung der erste Bindungspartner BP1 und das Konjugat umfassend den zweiten Bindungspartner BP2 und den dritten Bindungspartner BP3 gebunden werden, auf einer zweiten Halteeinrichtung der vierte

Bindungspartner BP4 immobilisiert wird, die beiden Halteeinrichtungen angenähert werden, so dass der dritte Bindungspartner BP3 und der vierte Bindungspartner BP4 aneinander binden können, die Menge an Konjugat umfassend den zweiten Bindungspartner BP2 und den dritten Bindungspartner BP3 bestimmt wird, die nach der Trennung von der ersten Halteeinrichtung auf die zweite Halteeinrichtung übertragen wurde, und/oder die Menge an Konjugat umfassend den zweiten Bindungspartner BP2 und den dritten Bindungspartner BP3 bestimmt wird, die nach der Trennung nicht von der ersten Halteeinrichtung auf die zweite Halteeinrichtung übertragen wurde; und in einer weiteren Durchführung (ii) auf der zweiten Halteeinrichtung der vierte Bindungspartner BP4 und das Konjugat umfassend den zweiten Bindungspartner BP2 und den dritten Bindungspartner BP3 gebunden werden, auf der ersten Halteeinrichtung der erste Bindungspartner BP1 immobilisiert wird, die beiden Halteeinrichtungen angenähert werden, so dass der zweite Bindungspartner BP2 und der erste Bindungspartner BP1 aneinander binden können, die Menge an Konjugat umfassend den zweiten Bindungspartner BP2 und den dritten Bindungspartner BP3 bestimmt wird, die nach der Trennung von der zweiten Halteeinrichtung auf die erste Halteeinrichtung übertragen wurde, und/oder die Menge an Konjugat umfassend den zweiten Bindungspartner BP2 und den dritten Bindungspartner BP3 bestimmt wird, die nach der Trennung nicht von der zweiten Halteeinrichtung auf die erste Halteeinrichtung übertragen wurde.

Bildet man den Quotienten aus dem Übertrag (an Konjugat) der ersten und der zweiten (reversen) Durchführung, so erhält man auch das Verhältnis der Trennkräfte der beiden Bindungskomplexe. Da die Kopplungseffizienz für beide Durchführungen als gleich angenommen werden kann, wird sie bei der Bildung des Quotienten heraus gekürzt und geht so nicht mehr in das Ergebnis mit ein. Eine Ausführung dieses Vorgehens ist in Experimentbeispiel 2 beschrieben.

Die "Doppelmarkierung" (c) wird im folgenden an Fall 2) (s.o.) erörtert:

Bei Fall 2) bedient man sich einer zweiten Markierung, deren Übertrag auf die zweite Oberfläche der Kopplungszahl entspricht. Eine Ausführung dieses Vorgehens ist in Experimentbeispiel 3 beschrieben. Im Unterschied zu 1) werden hier B1 und B2 gemeinsam auf der ersten Oberfläche vorgebildet, wobei das Konjugat und BP4 mit unterscheidbaren Markierungen versehen werden. Die Kopplung tritt ein, sobald der mit BP4 verbundene

Kopplungspartner durch die Annäherung der beiden Oberflächen an die zweite Oberfläche bindet, welche den zweiten Kopplungspartner trägt. Die Menge an BP4, die an der zweiten Oberfläche gebunden hat, entspricht somit der Kopplungszahl. Man bestimmt nun die Menge des markierten Konjugats, die auf die zweite Oberfläche übertragen wurde, bzw. die von der ersten abgelöst wurde. Ist diese Menge geringer als die Hälfte der Kopplungszahl, so kann man darauf schließen, daß der Komplex aus BP1 und BP2 eine größere Trennkraft aufweist als der Komplex aus BP3 und BP4. Ist die Menge des übertragenen Konjugats größer als die Hälfte der Menge der Kopplungen, so kann man darauf schließen, daß der Komplex aus BP1 und BP2 eine geringere Trennkraft aufweist als der Komplex aus BP3 und BP4. Eine Ausführung dieses Vorgehens ist in Experimentbeispiel 3 beschrieben.

Vorzugsweise wird demnach das Konjugat aus zweitem und drittem Bindungspartner, der zweite Bindungspartner oder der dritte Bindungspartner mit einer ersten Markierung versehen, und der erste oder der vierte Bindungspartner mit einer zweiten Markierung versehen, wobei die zweite Markierung von der ersten Markierung verschieden ist.

In einer Ausführungsform wird dann die Trennstelle detektiert, indem man die Menge an erster Markierung ermittelt, die an eine der Halteeinrichtungen gebunden ist, die Menge an zweiter Markierung ermittelt, die an dieselbe Halteeinrichtung gebunden ist, und die ermittelten Werte miteinander vergleicht und/oder zueinander in Beziehung setzt. Aus dem Verhältnis der Mengen an erster und zweiter Markierung, die beispielsweise an Stempel oder Unterlage gebunden sind, kann eine Aussage über das Ausmaß der Trennung von Proben- bzw. Referenzkomplex getroffen werden.

In einer Ausführungsform wird dabei zuerst die Verkettung, die den ersten, den zweiten, den dritten und den vierten Bindungspartner umfasst, auf einer ersten Halteeinrichtung gebildet und dann in einem zweiten Schritt die Kopplung mit einer zweiten Halteeinrichtung durchgeführt.

In einer anderen Ausführungsform werden entweder (i) auf einer ersten Halteeinrichtung der erste Bindungspartner BP1 und das Konjugat umfassend den zweiten Bindungspartner BP2 und den dritten Bindungspartner BP3 gebunden, auf einer zweiten Halteeinrichtung der vierte Bindungspartner BP4 immobilisiert, die beiden Halteeinrichtungen angenähert, so dass der dritte Bindungspartner BP3 und der vierte Bindungspartner BP4 aneinander binden können, oder (ii) auf der zweiten Halteeinrichtung der vierte Bindungspartner BP4 und das Konjugat umfassend den zweiten Bindungspartner BP2 und den dritten Bindungspartner BP3 gebunden,

auf der ersten Halteeinrichtung der erste Bindungspartner BP1 immobilisiert, die beiden Halteeinrichtungen angenähert, so dass der zweite Bindungspartner BP2 und der erste Bindungspartner BP1 aneinander binden können.

Es kann mindestens einer der Bindungspartner eine Nukleinsäure, insbesondere DNA umfassen. Vorzugsweise umfassen mindestens zwei der Bindungspartner eine natürliche oder künstliche Nukleinsäure.

#### Bevorzugte Ausführungsform der Erfindung

Bei der ersten bevorzugten Ausführungsform der Erfindung, bei der das Konjugat aus B1 und B2 zwischen zwei Oberflächen befestigt wird, wird die Zugkraft durch einen mechanischen, makroskopischen Zug angelegt, die Detektion erfolgt direkt über eine Markierung.

Diese Ausführungsform wird hier an den beiden Formaten erörtert, die sich auch durch alle anderen Ausführungsformen verwirklichen lassen, dem Sandwich- und dem Capture-Format:

Beim Sandwichformat des differentiellen Krafttests (Fig. 5) handelt es sich bei dem Konjugat aus BP2 und BP3 um die Probe (15). Ein Bindungspartner BP2 (2) der Probe ist spezifisch für einen Bindungspartner BP1 (1), der auf der ersten Oberfläche (13) gebunden ist. Ein weiterer Bindungspartner BP3 (3) ist spezifisch für einen der Bindungspartner BP4 (4), der auf der zweiten Oberfläche (14) gebunden ist. Bringt man die beiden Oberflächen in Kontakt, so kommt es zur Interaktion der Probe mit BP1 und BP4, wodurch die Oberflächen (13, 14) mittels der entstandenen Bindungskomplexe B1 und B2 verknüpft werden. Zieht man die Oberflächen nun auseinander, so bricht bevorzugt jener der beiden Bindungskomplexe, der die geringere Trennkraft aufweist. Die Probe haftet derjenigen Oberfläche an, zu der noch ein intakter Bindungskomplex besteht.

Beim Captureformat des differentiellen Krafttests (Fig. 6) wird die Probe (15) auf der ersten Oberfläche (13) immobilisiert. Die Probe verfügt über den ersten Bindungspartner BP1 (1), der spezifisch für den zweiten Bindungspartner BP2 (2) ist. BP2 ist mit BP3 (3) zu einem Konjugat verbunden, wobei BP3 einen vierten Bindungspartner BP4 bindet, der auf der zweiten Oberfläche (14) gebunden ist.

Man bringt beide Oberflächen in Kontakt, wodurch es zur Interaktion von BP1 mit BP2 kommt. Zieht man die Oberflächen nun auseinander, so bricht bevorzugt der schwächere der beiden Komplexe, d.h. entweder der Komplex aus BP1 mit BP2 oder der Komplex aus BP3

mit BP4. Die Verteilung des Konjugats aus BP2 und BP3 zwischen den beiden Oberflächen wird bestimmt und gibt Aufschluß darüber, welcher der beiden Komplexe der stabilere war.

Die Anbindung der Probe (15) im Captureformat kann kovalent oder über schwache Wechselwirkungen erfolgen.

Die bevorzugte Vorrichtung zur Ausführung der vorliegenden Erfindung besteht aus:

- i) Einem Verbrauchsmittel, das aus zwei Oberflächen zur Bindung der Reaktionspartner besteht
- ii) Den Bindungspartnern, die auf den Oberflächen gebunden sind
- iii) Einer Vorrichtung, um die beiden Oberflächen in Kontakt zu bringen und sie wieder zu trennen, nachdem es zur molekularen Interaktion der Bindungspartner gekommen ist.
- iv) Einer Markierung des Konjugats der Bindungspartner BP2 und BP3, anhand der die Verteilung zwischen den beiden Oberflächen bestimmt werden kann
- v) Einer Vorrichtung zur Detektion der Markierung

#### **Experimentelles Beispiel 1:**

#### **Krafttest zum Vergleich der Komplexe Biotin/ Streptavidin und Iminobiotin/ Streptavidin**

Das Experiment zeigt, daß durch einen differentiellen Krafttest die Unterschiede in der Trennkraft der Komplexe Biotin/Streptavidin und Iminobiotin/Streptavidin bestimmt werden können.

Prinzip:

Biotin- und Iminobiotin werden an einer Unterlage gebunden. Fluoreszenzmarkiertes Streptavidin wird an die immobilisierten Haptene gebunden. Ein Stempel, der mit Biotin beschichtet ist, wird so an die Unterlage angenähert, daß das am Stempel gebundene Biotin das über die Haptene an die Unterlage gekoppelte Streptavidin binden kann. Anschließend

wird der Stempel wieder entfernt. Zum Schluß wird bestimmt, welcher Anteil des Streptavidins vom Iminobiotin der Unterlage auf das Biotin des Stempels und welcher Anteil des Streptavidins vom Biotin der Unterlage auf das Biotins des Stempels übertragen wurde.

Beim Trennen der Oberflächen muß sich eine der beiden Bindungen lösen. Der Ligand bleibt dabei entweder am Stempel oder der Unterlage gebunden, je nachdem, welche der Bindungen mechanisch stabiler ist.

#### Durchführung:

##### *Beschichtung des Stempels*

Es wurde ein mikrostrukturierter Stempel aus PDMS (Polydimethylsiloxan) gefertigt. Die Strukturen bestanden dabei aus Stempelfüßchen von ca. 100 x 100  $\mu\text{m}$ , die durch Vertiefungen von ca. 25  $\mu\text{m}$  Breite und 1  $\mu\text{m}$  Tiefe getrennt wurden. Das in Kontakt bringen des Stempels und der Unterlage setzt voraus, daß der dazwischen befindliche Puffer verdrängt wird. Dies ist bei glatten Flächen nur äußerst schwierig bzw. langsam möglich. Die im Stempel befindlichen Rillen gewährleisten den schnellen Abfluß des Puffers und einen vollständigen Kontakt der Stempelfüße mit der Unterlage.

Ein weiterer Vorteil der Mikrostruktur besteht darin, daß auf der Unterlage spiegelbildlich zu den Stempelrillen keine Moleküle "weggestempelt" werden. Der Intensitätswert der verbleibenden "Gitter" repräsentiert die Dichte der Moleküle vor dem Stempeln und kann bei der Auswertung somit als Referenzwert herangezogen werden.

Zur Fertigung des mikrostrukturierten Stempels wurde ein Ansatz aus einer 1:10 Mischung von Silikonelastomer und Vernetzungsreagenz (Sylgard 184, Dow Corning) nach mehrfachem Entgasen zwischen einem entsprechend strukturierten Siliziumwafer und einer glatten Plexiglasplatte gegossen und senkrecht für 24h bei Raumtemperatur inkubiert. Nach der Polymerisierung wurde die strukturierte Oberfläche des Stempels bei 1mbar in einem Plasmaofen für 15s einem  $\text{H}_2\text{O}$ -Plasma ausgesetzt. Die oxidierte Oberfläche wurde mit 3% Aminosilan (3-Aminopropyltrimethoxysilan; ABCR, Karlsruhe) in 10%  $\text{H}_2\text{O}$  und 87% Ethanol für 30min inkubiert. Die silanierte Oberfläche wurde mit Reinstwasser gewaschen und mit Stickstoff trocken geblasen.

An die Aminogruppen des Silans wurde ein bifunktionales PEG angebunden, dessen eines Ende über eine durch NHS aktivierte Carboxygruppe, das andere über eine Biotingruppe verfügte. 20µl einer Lösung mit 2mg/100µl NHS-PEG-Biotin (Shearwater, Huntsville) wurden unter einem Deckglas für 1h auf einem Stempel mit einer Fläche von 1cm<sup>2</sup> inkubiert. Es wurde mit Reinstwasser gewaschen und mit Stickstoff trocken geblasen.

*Beschichtung der Unterlage:*

Ein Glasobjektträger wurde durch 100-minütige Behandlung mit gesättigter KOH-Ethanollösung gereinigt. Die gereinigte Oberfläche wurde mit 3% Aminosilan (3-Aminopropyltrimethoxysilan; ABCR, Karlsruhe) in 10% H<sub>2</sub>O und 87% Ethanol für 30min inkubiert. Die silanierte Oberfläche wurde mit Reinstwasser gewaschen und mit Stickstoff trocken geblasen. An die Aminogruppen des Silans wurde ein bifunktionales PEG angebunden dessen eines Ende über eine durch NHS aktivierte Carboxygruppe, das andere über eine t-Boc geschützte Aminogruppe verfügte (NHS-PEG NH-tBoc, Shearwater, Huntsville). Anschließend wurde die tBoc Schutzgruppe mit Trifluor Essigsäure abgespalten. NHS-Biotin und NHS-Iminobiotin (Sigma, St. Louis) wurden jeweils ausgehend von einer 50 mM Stammlösung in DMSO zu einer Endkonzentration von 5 mM mit PBS (phosphate buffered saline, Sigma) verdünnt. Aus dieser Lösung erfolgte die Anbindung von Biotin bzw. Iminobiotin an die aminofunktionalisierte Glasunterlage. Diese wurde für eine Stunde in einer gesättigten Wasseratmosphäre inkubiert, mit Reinstwasser gewaschen und mit Stickstoff trockengeblasen.

Zur Anbindung des Streptavidin-AlexaFluor®-546 Konjugates (Molecular Probes, Eugene) wurde eine Lösung mit einer Konzentration von 0,1 mg/ml in einem Glycin/NaOH-Puffer (pH 10) hergestellt. Die Unterlage wurde 20 min mit der Lösung inkubiert, anschliessend 5 min in diesem Puffer gewaschen und mit Stickstoff trocken geblasen.

*Stempeln:*

Die Stempelprozedur kann mit einem einfachen Apparat erfolgen, wie er beispielsweise in Figur 7 dargestellt ist. Die Apparatur besteht aus einer Bodenplatte (1), zwei Führungsstangen (2), einem Stempelschlitten (3), einer Stempelkopfpolsterung (4), dem Stempelkopf (5) und der Stempelpolsterung (6) (siehe Figur 7). Die Bodenplatte, die Führungsstangen und der Stempelschlitten können aus Metall gefertigt sein. Das Stempelkopfpolster kann aus einem

Schaumgummi und der Stempelkopf aus Plexiglas bestehen. Der Stempel ist quadratisch und hat die Fläche von einem  $\text{cm}^2$  und eine Dicke von 1 mm. Das Stempelpolster hat die gleichen Abmessungen, ist jedoch auf beiden Seiten glatt und besteht z.B. aus einem besonders weichen PDMS.

Zum Stempeln wird die Unterlage auf die Bodenplatte und der Stempel auf das Stempelpolster gelegt. Beide werden mit Puffer (pH 10) bedeckt. Der Schlitten wird in die Führungsstangen eingeführt und solange per Hand abgesenkt, bis der Stempel mit der Unterlage in Kontakt kommt. Das Trennen erfolgt ebenfalls per Hand.

Das Stempelkopfpolster hat die Funktion, den Stempelkopf beim Aufsetzen des Stempels in eine exakt parallele Position zur Unterlage zu bringen. Das Stempelpolster dient dazu, geringe Unebenheiten zwischen Stempel und Unterlage auszugleichen.

Die Oberflächen wurden so einander angenähert, daß das auf dem Stempel gebundene Biotin mit dem Streptavidin der Unterlage interagieren kann. Nach einer Inkubationszeit von 30min wurden die Oberflächen voneinander getrennt.

#### *Messung*

Stempel und Unterlage wurden mit einem Laser-Scanner (Perkin Elmer GeneTAC LS IV) nach dem Marker Alexa-Fluor®-546 abgescannt.

#### *Auswertung und Ergebnis:*

Der unterschiedliche Übertrag von Biotin bzw. Iminobiotin nach Biotin spiegelt die unterschiedliche mechanische Stabilität der Streptavidin-Hapten Komplexe wieder. Der Übertrag von Biotin auf Biotin entspricht der Hälfte der tatsächlichen Kopplungereignisse, d.h. die Kopplungszahl entspricht dem doppelten Übertrag.

15% des an Biotin gebundenen Streptavidins werden von dem mit Biotin beschichteten Stempel mitgenommen. Von Iminobiotin auf Biotin werden 30% übertragen. Unter der Annahme, daß die Kopplungseffizienz für beide Versuche gleich ist und unter der Voraussetzung, daß die Dichte des Iminobiotin und des Biotin auf der Unterlage gleich groß ist, kann man darauf schließen, daß die Streptavidin-Biotin-Bindung stärker ist als die

**Streptavidin-Iminobiotin-Bindung.**

Figur 8A und 8B zeigen eine Darstellung der Unterlage bzw. des Stempels nach dem Stempeln. Messungen mit dem AFM-Kraftspektrometer ergaben für das Rezeptor-Ligand Paar Biotin/Avidin  $160\text{pN} \pm 20\text{pN}$  und  $85 \pm 15$  für Iminobiotin/Avidin (Florin, E. L., Moy V. T. and Gaub H. E. Science 15 April 1994, Vol. 264, pp. 415-417: "Adhesion Forces Between Individual Ligand-Receptor Pairs"). Der Kraftvergleich zwischen Biotin/Streptavidin und Iminobiotin/Streptavidin kommt qualitativ zum gleichen Ergebnis.

**Experimentelles Beispiel 2:****Krafttest mit reversem Stempeln am Beispiel eines Vergleichs der Komplexe Biotin/Streptavidin und Desthiobiotin/Streptavidin**

Das Experiment zeigt, daß durch einen differentiellen Krafttest mit reversem Stempeln die Unterschiede in der Trennkraft der Komplexe Biotin/Streptavidin und Desthiobiotin/Streptavidin bestimmt werden können.

***Herstellung von Stempel und Unterlage:***

Es wurde ein mikrostrukturierter Stempel aus PDMS (Polydimethylsiloxan) gefertigt. Die Strukturen bestanden dabei aus Stempelfüßchen von ca.  $100 \times 100 \mu\text{m}$ , die durch Vertiefungen von ca.  $25 \mu\text{m}$  Breite und  $1 \mu\text{m}$  Tiefe getrennt wurden. Das In-Kontakt-bringen des Stempels und der Unterlage setzt voraus, daß der dazwischen befindliche Puffer verdrängt wird. Dies ist bei glatten Flächen nur äußerst schwierig bzw. langsam möglich. Die im Stempel befindlichen Rillen gewährleisten den schnellen Abfluß des Puffers und einen vollständigen Kontakt der Stempelfüße mit der Unterlage.

Ein weiterer Vorteil der Mikrostruktur besteht darin, daß auf der Unterlage spiegelbildlich zu den Stempelrillen keine Moleküle "weggestempelt" werden. Der Intensitätswert der verbleibenden "Gitter" repräsentiert die Dichte der Moleküle vor dem Stempeln und kann bei der Auswertung somit als Referenzwert herangezogen werden.

Zur Fertigung des 1 mm dicken, mikrostrukturierten Stempels wurde ein Ansatz aus einer

1:10 Mischung von Silikonelastomer und Vernetzungsreagenz (Sylgard 184, Dow Corning) nach mehrfachem Entgasen zwischen einen entsprechend strukturierten Siliziumwafer und eine glatte Plexiglasplatte gegossen und senkrecht für 24h bei Raumtemperatur polymerisiert.

Die Unterlage bestand ebenfalls aus 1 mm dickem PDMS. Jedoch war die Unterlage nicht strukturiert. Zur Fertigung wurde die Mischung zwischen zwei senkrecht stehende Plexiglasplatten gegossen und ebenfalls 24h bei Raumtemperatur inkubiert.

*Beschichtung von Stempel und Unterlage:*

Die polymerisierten strukturierten und nicht strukturierten PDMS-Platten wurden auf eine Größe von 1 cm<sup>2</sup> zugeschnitten. Anschließend wurden die Stücke in einem Plasmaofen bei 2 mbar für 30 s einem H<sub>2</sub>O-Plasma ausgesetzt. Die oxidierte Oberfläche wurde mit einer Lösung aus 2% Aldehydsilan (4-Triethoxysilylbutanal, Amchro, Hattersheim, Deutschland) in 10% H<sub>2</sub>O und 88% Ethanol für 30 min inkubiert. Die silanisierte Oberfläche wurde mit Ethanol und Reinstwasser gewaschen und mit Stickstoff trockengeblasen.

Die funktionalisierten Unterlagen und Stempel wurden über Nacht in PBS (phosphate buffered saline; Sigma, St. Louis, USA) mit 2% BSA (bovine serum albumin; Roth, Karlsruhe, Deutschland) inkubiert. Dabei bindet BSA mit seinen Aminogruppen an die Aldehydgruppen der Oberfläche. Zur Stabilisierung wurden die entstanden Schiff schen Basen mit 1 % Natriumborhydrid für 15 min reduziert. An nicht verbrauchte Aminogruppen des BSA wurde dann durch NHS aktiviertes Biotin und Desthiobiotin (Sigma, St. Louis, USA) gebunden. Dazu wurden jeweils 50 mM Stammlösungen in DMSO hergestellt. Diese wurden anschließend zur Herstellung einer 5 mM Reaktionslösung mit PBS verdünnt, wobei 50 mM EDC (1-Ethyl-3-(Dimethylamino-propyl)carbiimide; Sigma, St. Louis) und 25 mM NHS (N-hydroxy succinimid; Sigma, St. Louis) zur Aktivierung zugesetzt wurden. Die Reaktionslösung wurde 15 min vorinkubiert und anschließend für 30 min auf der BSA-Oberfläche inkubiert. Zusätzlich auf dem BSA aktivierte Carboxygruppen wurden 2 h in einer 0,1M Glycinlösung geblockt. Stempel und Unterlagen wurden mit Reinstwasser gewaschen und mit Stickstoff trockengeblasen.

Je nach Stempelansatz wurde ein fluoreszenzmarkiertes Streptavidin-AlexaFluor®-647

Konjugat (Molecular Probes, Eugene) an der Unterlage oder am Stempel angebunden. Eine 0,1 mg/ml konzentrierte Lösung in PBS mit 0.05% Tween20 (Sigma, St. Louis, USA) wurde dazu 20 min auf der entsprechenden Fläche inkubiert.

*Stempeln:*

Die Stempelprozedur kann mit einem einfachen Apparat erfolgen, wie es beispielsweise in Figur 7 dargestellt ist. Die Apparatur besteht aus einer Bodenplatte (1), zwei Führungsstangen (2), einem Stempelschlitten (3), einer Stempelkopfpolsterung (4), dem Stempelkopf (5) und der Stempelpolsterung (6) (siehe Figur 7). Die Bodenplatte, die Führungsstangen und der Stempelschlitten können aus Metall gefertigt sein. Das Stempelkopfpolster kann aus einem Schaumgummi und der Stempelkopf aus Plexiglas bestehen. Der Stempel kann quadratisch sein und hat in dieser Ausführungsform die Fläche von einem  $\text{cm}^2$  sowie eine Dicke von 1 mm. Das Stempelpolster hat die gleichen Abmessungen, ist jedoch auf beiden Seiten glatt und besteht z.B. aus besonders weichem PDMS.

Das Stempelkopfpolster hat die Funktion, den Stempelkopf beim Aufsetzten des Stempels in eine exakt parallele Position zur Unterlage zu bringen. Das Stempelpolster dient dazu, geringe Unebenheiten zwischen Stempel und Unterlage auszugleichen.

Zum Stempeln wird die Unterlage auf die Bodenplatte und der Stempel auf das Stempelpolster gelegt. Beide werden mit Puffer bedeckt. Der Schlitten wird in die Führungsstangen eingeführt und solange per Hand abgesenkt, bis der Stempel mit der Unterlage in Kontakt kommt. Das Trennen erfolgt ebenfalls per Hand.

Die Oberflächen wurden so einander angenähert, dass der freie Bindungspartner auf der einen Oberfläche mit dem Komplex aus Streptavidin und dem jeweils anderen Bindungspartner auf der anderen Oberfläche interagieren kann. Nach einer Inkubationszeit von 30 min wurden die Oberflächen voneinander getrennt.

Folgende reverse Ansätze wurden durchgeführt:

Ansatz	1	2	3	4
Stempel	Biotin Streptavidin	Desthiobiotin Streptavidin	Biotin	Desthiobiotin
Unterlage	Desthiobiotin	Biotin	Streptavidin Desthiobiotin	Streptavidin Biotin

Die Anbindung des Streptavidins auf Unterlage oder Stempel muß bei gleichen Oberflächen zum gleichen Ergebnis führen und dient daher als Kontrolle.

Stempel und Unterlage wurden mit einem Laserscanner (GenePix 4000B, Axon Instruments Inc., USA) nach dem Marker AlexaFluor®-647 abgescannt.

*Auswertung und Ergebnis:*

**Prinzip:**

Die reverse Ausführung ermöglicht eine von der Kopplungseffizienz unabhängige Auswertung. Dabei können sich auf der ersten und zweiten Oberfläche unterschiedliche Dichten an Bindungspartnern befinden. [Dies wird dadurch erreicht, daß nur die maximal möglichen Kopplungen berücksichtigt werden, da nur diese sich auf die beiden Oberflächen aufteilen können. ] Bei der Auswertung werden nur die übertragenen Fluorophore berücksichtigt. Figur 12 zeigt, daß das Verhältnis der Bindungskräfte der verschiedenen Bindungskomplexe B1 und B2 aus dem Quotienten der Fluoreszenzintensität, die auf Oberfläche 1 übergeht, und der, die auf Oberfläche 2 übergeht, berechnet werden kann (Fig. 12B: Zahl der von der ersten auf die zweite Oberfläche übertragenen Fluorophore =2; Fig 12D: Zahl der von der zweiten auf die erste Oberfläche übertragenen Fluorophore =6). Dabei wird lediglich vorausgesetzt, daß auf der Oberfläche, die die geringere Dichte an Bindungspartnern aufweist, eben diese Dichte für beide Teildurchführungen der reversen Ausführung konstant ist. Diese Annahme ist aufgrund der sehr ähnlichen Eigenschaften der zu vergleichenden Bindungspartner BP1 und BP4 (z.B. Größe) hier zulässig und kann auch durch eine Messung der Fluoreszenzintensität vor dem Stempeln überprüft werden. Nicht in Betracht gezogen wird bei diesem Auswertearnsatz der Einfluß unterschiedlicher Affinitätskonstanten auf die Kopplungseffizienz.

Figur 13 zeigt beispielhaft die Meßergebnisse und deren Auswertung. Da hier zwei Spots in Kontakt gebracht wurden, die nicht völlig deckungsgleich waren, kann im Überlappungsbereich der Spots der Gesamtübertrag und daneben der unspezifische Übertrag mit Hilfe von Linescans ermittelt werden. Aus allen Reihen der Spots, die in 2 unabhängigen Versuchen gemessen wurden, wurden die Mittelwerte für Gesamtübertrag und unspezifischen Übertrag berechnet. Der spezifische Übertrag ergibt sich aus der Differenz von Gesamtübertrag und unspezifischem Übertrag.

Die Mittelwerte der reversen Ansätze der Stempelexperimente sind in folgenden Tabellen dargestellt:

Übertrag des Streptavidins von der Unterlage auf den Stempel:

Kombination	Gesamtübertrag	unspezifisch	spezifisch
Biotin->Desthiobiotin	$9600 \pm 2500$	$7600 \pm 900$	2000
Desthiobiotin->Biotin	$23600 \pm 5200$	$10200 \pm 1600$	13400

Übertrag des Streptavidins vom Stempel auf die Unterlage:

Kombination	Gesamtübertrag	unspezifisch	spezifisch
Biotin->Desthiobiotin	$10800 \pm 3700$	$7500 \pm 1900$	3300
Desthiobiotin->Biotin	$23200 \pm 700$	$6900 \pm 1100$	16300

Im Rahmen der Meßgenauigkeit liefern beide Versuche das gleiche Ergebnis. Der Quotient aus dem Übertrag auf Desthiobiotin und dem Übertrag auf Biotin beträgt im Mittel 0,18. Anhand dieses Verhältnisses ist eine eindeutige qualitative Aussage über die Bindungskräfte möglich: Das reverse Stempeln zeigt, daß die Bindungskraft zwischen Streptavidin und Desthiobiotin schwächer ist als die Bindungskraft zwischen Streptavidin und Biotin. Da es sich bei Streptavidin/Biotin/Desthiobiotin um ein komplexes System handelt, in dem Mehrfachbindungen an eine Oberfläche möglich sind, ist eine quantitative Aussage zum Verhältnis der Bindungskräfte nur eingeschränkt möglich.

**Experimentelles Beispiel 3:**  
**Krafttest zum Vergleich zweier DNA-Duplex**

Das Experiment zeigt, daß durch einen differentiellen Krafttest die Trennkkräfte zweier DNA-Duplex verglichen werden können. In diesem Beispiel handelt es sich bei Duplex 1 um einen 20 Basenpaare langen Doppelstrang, bei Duplex 2 um einen 30 Basenpaare langen Doppelstrang.

*Prinzip:*

Oligonukleotid 1 (=Oligo1) wird terminal an einer Unterlage gebunden. Oligonukleotid 2 (=Oligo2) wird mit Oligo1 hybridisiert, wobei ein Probekomplex gebildet wird. Oligonukleotid 3 (=Oligo3) wird mit Oligo2 hybridisiert, wobei ein Referenzkomplex gebildet wird. Oligo2 und Oligo3 sind mit unterschiedlichen Fluorophoren markiert. Oligo3 ist zusätzlich mit einem Biotin markiert. Ein Stempel, der mit Streptavidin beschichtet ist wird auf die Unterlage mit den drei hybridisierten Oligos aufgepreßt. Dabei kommt es zur Bindung des Biotin von Oligo3 an das Streptavidin des Stempels. Der Stempel wird entfernt, wobei es in einer Verkettung von Oligo1 mit Oligo2 und Oligo3, entweder zum Zerreißen des Probekomplexes oder des Referenzkomplexes kommt.

Beim Probenkomplex handelt es sich um einen DNA-Duplex von 20bp. Der Referenzkomplex besteht aus einem DNA-Duplex von 30bp, von denen 20 mit denen des Probenkomplexes identisch sind. Als Referenz wird ein zweites Experiment durchgeführt, bei dem Proben- und Referenzkomplex 20bp lang sind und den gleichen GC-Gehalt aufweisen.

Da die Effizienz, mit der die Kopplung der auf der Unterlage vorgebildeten Verkettungen über die Biotin-Streptavidin-Bindung erfolgt, beim Stempeln nur bedingt kontrollierbar ist, kann man sich bei dem Krafttest nicht darauf beschränken nur Oligo2 zu markieren, um das Verhältnis der Trennkkräfte von Proben- und Referenzkomplex zu berechnen. Man benötigt eine zweite Markierung an Oligo3. Bestimmt man anhand der beiden Markierungen, wieviel Oligo2 im Verhältnis zu Oligo3 auf dem Stempel angereichert, bzw. auf der Unterlage abgereichert wurde, so erhält man ein Maß dafür, ob Oligo2 eine größere Trennkraft zu Oligo1 oder Oligo3 aufweist.

Es ist darauf zu achten, daß bei einer Fluoreszenzmarkierung der Oligos keine Verfälschung des Meßergebnisses durch einen Fluoreszenz-Resonanz-Transfer (FRET) zwischen den Markierungen stattfindet. Da ein geringes Ausmaß von FRET zwischen den Markierungen einer Verkettung oft unvermeidlich ist, ist darauf zu achten, daß die Markierungen innerhalb einer Verkettung bei Experiment und Referenzexperiment den gleichen Abstand voneinander haben.

Experiment: 20bp gegen 30bp (= Experiment 2a)

```

5' NH2-AAAAAAAAA TCTCCGGCTTACGGCGTAT Oligo1
||||||||||||||||| .
3' Cy3-AGAGGCCGAAATGCCGCATA TTGGGGAGCAATGCTAATAGTT TCCCTGAAAGTCGTCTCTCAGACCCCTCGTT Oligo2a
||||||||||||||||| .
oligo3 5' Cy5-AGGGACTTTCAAGCAGAGAGTCGGGAGCAA AAAAAAAAAA-Bio

```

Referenzexperiment: 20bp gegen 20bp (= Experiment 2b)

```

5' NH2-AAAAAAAAA TCTCCGGCTTACGGCGTAT Oligo1
||||||||||||||||| .
3' Cy3-AGAGGCCGAAATGCCGCATA TTGGGGAGCAATGCTAATAGTT TCCCTGAAAGTCGTCTCTCA Oligo2b
||||||||||||||||| .
oligo3 5' Cy5-AGGGACTTTCAAGCAGAGAGTCGGGAGCAA AAAAAAAAAA-Bio

```

*Durchführung:*

1. Beschichtung der Unterlage:

Als Unterlage wurden mit Aldehydgruppen funktionalisierte Glas-Objektträger (Telechem, Atlanta: Superaldehyde Slides) verwendet. Als Passivierung gegen die Adsorption des Streptavidins des Stempels wurde an die Glasoberfläche kovalent Polyethylenglykol (PEG) angebunden. Dazu wurden 2mg bifunktionales PEG (Shearwater, Huntsville; Molekulargewicht = 3400g/mol) mit je einer terminalen Amino- und einer terminalen Carboxygruppe, in 100µl PBS (Phosphate Saline Buffer; Sigma, St. Louis) gelöst und unter einem Deckglas für 2h auf dem Objektträger inkubiert. Die aus der Reaktion der Amino- mit den Aldehydgruppen resultierenden Schiffbasen wurden für 5min mit einer 1%igen NaBH<sub>4</sub>-Lsg reduziert. Daraufhin wurde die Unterlage mit Reinstwasser gewaschen und mit einem ölfreien Stickstoffstrahl trocken geblasen.

**2. Anbindung von Oligo1:**

Oligo1: 5' NH2-AAAAAAAAAA TCTCCGGCTTACGGCGTAT (SEQ ID NO:1)

Oligo1 verfügt am 5'-Ende über eine Amino-Markierung und einen Spacer aus 10 Adeninen. Die weiteren 20 Basen bilden mit Oligo2 den Probenkomplex. Mehrere Tropfen von je 1 $\mu$ l einer Mischung aus 25 $\mu$ M Oligo1 mit 5mg/ml EDC (1-Ethyl-3-(3-Dimethylamino-propyl)carbimid; Sigma, St. Louis) und 5mg/ml NHS (N-hydroxy-succinimid; Sigma, St. Louis) in PBS (Phosphate Saline Buffer; Sigma, St. Louis) wurden auf die beschichtete Unterlage gespottet. Die Unterlage wurde in einer gesättigten H<sub>2</sub>O-Atmosphäre für 1h inkubiert, mit 0,2% SDS (Sodiumdodecylsulfat; Sigma St. Louis) gewaschen, mit Reinstwasser gespült und mit Stickstoff trocken geblasen.

**3. Hybridisierung:****Oligo2a:**

5' TTGCTCCCAGACTCTGCTGAAAGTCCCTTGATAATCGTAACGAGGGGTTACGCCGTAAAGCCGGAGA-Cy3  
(SEQ ID NO:2)

**Oligo2b:**

5' ACTCTCTGCTGAAAGTCCCTTGATAATCGTAACGAGGGGTTACGCCGTAAAGCCGGAGA-Cy3  
(SEQ ID NO:3)

**Oligo3:**

5' CY5-AGGGACTTTCAGCAGAGTCAGGGAGCAA AAAAAAAAAA-BIO  
(SEQ ID NO:4)

Die Oligos 2a und 2b verfügen über eine Cy3®-Markierung (Cyanine3, Amersham-Pharmacia Biotech) am 5'-Ende. Oligo 3 verfügt über eine Cy5®-Markierung (Cyanine5, Amersham-Pharmacia) am 5'-Ende (alle Oligos von metabion, Martinsried).

5 $\mu$ l einer Mischung aus Oligo2a (1 $\mu$ M) und Oligo3 (2 $\mu$ M) in einem Citrat-Puffer (pH=7,2) mit 750mM NaCl wurden unter einem Deckglas über die Spots des angebundenen Oligo1 gegeben. Der Hybridisierungsansatz wurde in einer gesättigten H<sub>2</sub>O-Atmosphäre bei

80°C für 15min inkubiert, und anschließend auf Raumtemperatur abgekühlt. Die Unterlage wurde einmal mit 15mM NaCl/0,2% SDS und ein zweites Mal mit 15mM NaCl bei Raumtemperatur gewaschen. Anschließend wurde mit Reinstwasser gespült und mit Stickstoff trockengeblasen. Ebenso wurde bei dem Referenzexperiment verfahren, wobei Oligo2a gegen Oligo2b ausgetauscht wurde.

#### 4. Beschichtung des Stempels:

Es wurde ein 1mm dicker, mikrostrukturierter Stempel aus PDMS (Polydimethylsiloxan) gefertigt. Die Strukturen bestanden dabei aus Stempelfüßchen von ca. 100 x 100 µm, die durch Vertiefungen von ca. 25µm Breite und einem µm Tiefe getrennt wurden. Hierzu wurde ein Ansatz aus einer 1:10 Mischung von Silikonelastomer und Vernetzungsreagenz (Sylgard 184, Dow Corning) nach mehrfachem Entgasen zwischen einen entsprechend strukturierten Siliziumwafer und eine glatte Plexiglasplatte gegossen und für 24h bei RT inkubiert. Nach der Polymerisierung wurde die strukturierte Oberfläche des Stempel bei 1mbar in einem Plasmaofen für 15s einem H<sub>2</sub>O-Plasma ausgesetzt.

Die oxidierte Oberfläche wurde mit 3% Aminosilan (3-Aminopropyldimethyl-ethoxysilan; ABCR, Karlsruhe) in 10% H<sub>2</sub>O und 87% Ethanol für 30min inkubiert. Die silanisierte Oberfläche wurde zuerst mit Ethanol, dann mit Reinstwasser gewaschen und mit Stickstoff trocken geblasen. An die Aminogruppen des Silans wurde ein bifunktionales PEG angebunden dessen eines Ende über eine durch NHS aktivierte Carboxygruppe, das andere über eine Biotingruppe verfügte. 20µl einer Lösung mit 20mg/ml NHS-PEG-Biotin (Shearwater, Huntsville) wurden unter einem Deckglas für 1h auf einem Stempel mit einer Fläche von 1cm<sup>2</sup> inkubiert. Es wurde mit Reinstwasser gewaschen und mit Stickstoff trocken geblasen. Auf die nun biotinylierte Oberfläche wurde 0,1mg/ml Streptavidin (Sigma) in PBS gegeben und für 30min inkubiert. Es wurde mit Reinstwasser gewaschen und mit Stickstoff trocken geblasen.

#### 5. Stempeln:

Ein frisch präparierter Stempel und eine Unterlage wurden mit einer Lösung von 15mM NaCl unter einem Druck von 400g/cm<sup>2</sup> auf die Flecken mit den angebundenen Oligos (Oligo1 + Oligo2 + Oligo3) gepreßt. Nach 30min wurde der Stempel sehr langsam abgehoben. Unterlage und Stempel wurden mit Reinstwasser gewaschen und mit Stickstoff

trocken geblasen.

6. Stempel und Unterlage wurden mit einem Zweifarben-Laser-Scanner (Perkin Elmer GeneTAC LS IV) nach den Markern Cy3 und Cy5 abgescannt. Um eine Vergleichbarkeit der Meßergebnisse zu gewährleisten, wurden die Stempel von Experiment und Referenzexperiment sowie die Unterlagen von Experiment und Referenzexperiment mit gleichen Laserintensitäten gescannt.

*Auswertung:*

Für jedes Experiment wurde der Stempel und die Unterlage ausgewertet.

*Auswertung der Unterlagen:*

Durch Subtraktion der Intensitäten der gestempelten Flächen von den Intensitäten der nicht gestempelten Rillen wurden die Differenzen  $\Delta Cy3_{Unt}$  und  $\Delta Cy5_{Unt}$  gebildet. Aus den beiden Differenzen für Experiment A (Oligo2a) wurde der Quotient  $Q_{A\ Unt} = \Delta Cy3_{Unt} / \Delta Cy5_{Unt}$ , aus den Differenzen für Experiment B (Oligo2b) der Quotient  $Q_{B\ Unt} = \Delta Cy3_{Unt} / \Delta Cy5_{Unt}$  gebildet. Als Maß für den Unterschied der Abreicherung von Oligo 2a bzw. Oligo2b auf der Unterlage wurde der Quotient  $Q_{Unt} = Q_{A\ Unt} / Q_{B\ Unt}$  gebildet.

*Auswertung der Stempel:*

Durch Subtraktion der Intensitäten der Rillen, auf die keine Oligos übertragen wurden von den Intensitäten der Stempelflächen wurden die Differenzen  $\Delta Cy3_{St}$  und  $\Delta Cy5_{St}$  gebildet. Aus den beiden Differenzen für Experiment A (Oligo2a) wurde der Quotient  $Q_{A\ St} = \Delta Cy3_{St} / \Delta Cy5_{St}$ , aus den Differenzen für Experiment B (Oligo2b) der Quotient  $Q_{B\ St} = \Delta Cy3_{St} / \Delta Cy5_{St}$  gebildet. Als Maß für den Unterschied der Anreicherung von Oligo 2a bzw. Oligo2b auf dem Stempel wurde der Quotient  $Q_{St} = Q_{A\ St} / Q_{B\ St}$  gebildet.

*Ergebnis:*

Für die Unterlage von Experiment 2b ergab sich der Wert  $Q_{B\ Unt} = 0,36 \pm 0,08$  für die Unterlage von 2a  $Q_{A\ Unt} = 0,69 \pm 0,09$ . Hieraus ergab sich  $Q_{Unt} = Q_{A\ Unt} / Q_{B\ Unt} = 1,92$ .

Für den Stempel von 2b ergab sich  $Q_{B St} = 0,61 \pm 0,08$ , für den Stempel von 2a  $Q_{A St} = 1,20 \pm 0,08$ . Hieraus ergab sich  $Q_{St} = Q_{A St} / Q_{B St} = 1,97$ .

Bei Experiment 2a handelte es sich um einen Kraftvergleich eines 30bp-Duplex auf der Seite des Stempels und einen 20bp-Duplex auf Seite der Unterlage. Betrachtet man das Ergebnis zu 2a ( $Q_{A Unt} = 0,69$ ,  $Q_{A St} = 1,2$ ) isoliert, so läßt sich keine Aussage darüber treffen, ob einer der beiden Duplexe stabiler war, bzw. welcher der beiden beim Trennen des Stempels von der Unterlage häufiger zerriß als der andere. Eine solche Aussage aus Experiment 2a allein wäre nur möglich, wenn man aus den gemessenen Fluoreszenz-Intensitäten die tatsächlichen Stoffmengen an Cy3 und Cy5 berechnen könnte. Da beim vorliegenden Experiment entsprechende Eichwerte nicht vorliegen, soll zu dem Kraftvergleich des 30bp-Duplex mit dem 20bp-Duplex in Experiment 2a der Kraftvergleich des 20bp-Duplex mit einem weiteren 20bp-Duplex in Experiment 2b als Referenz herangezogen werden.

Die Quotienten aus Experiment 2a und Referenzexperiment 2b ergeben für die Unterlage  $Q_{Unt} = Q_{A Unt} / Q_{B Unt} = 1,92$  und für den Stempel  $Q_{St} = Q_{A St} / Q_{B St} = 1,97$ . Dies bedeutet, daß auf der Unterlage 2a etwa 2 mal so viel Cy3-markierter Oligo weggestempelt wurde wie bei 2b und daß auf den Stempel etwa 2 mal so viel Cy3-markierter Oligo übertragen wurde wie bei 2b.

Bei einer Messung, bei der die gleiche Zahl von Cy5- und Cy3-Fluorophoren gleiche Fluoreszenzintensitäten hätten, würde man beim Referenzexperiment 2b aufgrund der gleichen Stabilität der beiden 20bp-Duplexe ein  $Q_{B Unt} = 0,5$  und ein  $Q_{B St} = 0,5$  erwarten. Der hier ermittelte  $Q_{B Unt} = 0,36$  ist gegenüber dem bei einer geeichten Messung zu erwartenden Ergebnis um den Faktor 1,39 zu klein. Korrigiert man  $Q_{B Unt}$  um diesen Faktor auf 0,5, so erhält man für die Korrektur von Experiment 2a

$$Q_{A Unt \text{ korr.}} = Q_{A Unt} \times 1,39 = 0,69 \times 1,39 = 0,96.$$

Für den PDMS-Stempel muß aufgrund der speziellen Fluoreszenzeigenschaften des Materials ein eigener Korrekturfaktor errechnet werden. Man erhält analog zur Unterlage:

$$Q_{B St \text{ korr.}} = 0,5 = Q_{B St} \times 0,82$$

$$Q_{A St \text{ korr.}} = 1,20 \times 0,82 = 0,98$$

Hieraus kann geschlossen werden, daß bei allen gebildeten Verkettungen 97% aller Probenkomplexe (20bp) zerissen und nur 3% aller Referenzkomplexe (30bp).

Figur 9A und 9B zeigen eine Darstellung der Unterlage bzw. des Stempels nach dem Stempeln bei Experiment 2a. Figur 9C und 9D zeigen eine Darstellung der Unterlage bzw. des Stempels nach dem Stempeln bei Experiment 2b. Es ist jeweils nur der Farbstoff Cy3 dargestellt.

Figuren 10A und 10C zeigen das Ergebnis der Unterlage nach Kraftvergleich mit Oligonukleotid 2a bzw. 2b. Figuren 10B und 10D zeigen entsprechend das Ergebnis für die Stempel. Es handelt sich um Ausschnitte von Fluoreszenzprofilen. Der Verlauf der Profile wird durch den Pfeil in Figur 9C angedeutet. Die Maxima der Graphen 10A und 10C entsprechen den hellen Gitterlinien, die nicht gestempelte Bereiche der Unterlage repräsentieren. Die zwischen den Peaks liegenden Minima entsprechen den dunklen Quadranten, von denen in Folge des Kontakts mit dem auf den Stempelfüßchen gebundenen Streptavidins Oligos weggestempelt wurden. Die Minima der Graphen in 10B und 10D entsprechen den dunklen Gitterlinien auf den Stempeln, auf die kein Fluorophor übertragen wurde. Die Maxima entsprechen den hellen Quadranten, auf die, in Folge des Kontakts mit der Unterlage, Oligos auf den Stempel übertragen wurden.

$Q_{st}$  und  $Q_{Unt}$  ergaben, daß der Duplex zwischen Oligo2a und Oligo3 eine mindestens 50% größere Trennkraft aufweist als der Duplex zwischen Oligo2b und Oligo3.

**Patentansprüche:**

1. Verfahren zur Charakterisierung und/oder zum Nachweis eines Bindungskomplexes, mit den Schritten:  
Bereitstellen eines ersten Bindungspartners und eines Konjugats aus einem zweiten und einem dritten Bindungspartner und Bereitstellen eines vierten Bindungspartners  
Bilden einer Verkettung der Bindungspartner, wobei der erste Bindungspartner mit dem zweiten Bindungspartner einen Probenkomplex und der dritte Bindungspartner mit dem vierten Bindungspartner einen Referenzkomplex ausbildet,  
Aufbringen einer Kraft an die Verkettung, die zur Trennung des Probenkomplexes oder des Referenzkomplexes führt und  
Bestimmen welcher der beiden Bindungskomplexe getrennt wurde.
2. Verfahren nach Anspruch 1, wobei zunächst das Konjugat aus dem zweiten und dritten Bindungspartner bereitgestellt wird und anschließend der Probenkomplex und/oder der Referenzkomplex gebildet wird.
3. Verfahren nach Anspruch 1, wobei zunächst der Probenkomplex und/oder der Referenzkomplex gebildet wird und anschließend das Konjugat durch Verbinden des zweiten und dritten Bindungspartners bereitgestellt wird.
4. Verfahren nach Anspruch 3, mit den Schritten Immobilisieren des ersten Bindungspartners an einer ersten Halteeinrichtung, Immobilisieren des vierten Bindungspartners an einer zweiten Halteeinrichtung, Herstellen des Probenkomplexes durch In-Kontakt-Bringen des immobilisierten ersten Bindungspartners mit dem zweiten Bindungspartner, Herstellen des Referenzkomplexes durch In-Kontakt-Bringen des immobilisierten vierten Bindungspartners mit dem dritten Bindungspartner, Annähern der ersten und zweiten Halteeinrichtung, wobei der zweite und dritte Bindungspartner miteinander in Wechselwirkung treten können.

5. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 4, wobei der erste Bindungspartner und der vierte Bindungspartner gleich sind.
6. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 5, wobei es sich bei dem ersten und dem zweiten Bindungspartner um einen Liganden und einen Rezeptor handelt, die spezifisch aneinander binden.
7. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 5, wobei der Probenkomplex auf einer unspezifischen Wechselwirkung beruht.
8. Verfahren nach Ansprüche 1 bis 7, wobei der Referenzkomplex auf einer spezifischen oder einer unspezifischen Wechselwirkung beruht.
9. Verfahren nach Ansprüche 1 bis 8, wobei mindestens einer der Bindungspartner vorzugsweise des Probenkomplexes ein Körper ist.
10. Verfahren nach einem der vorstehenden Ansprüche, wobei mindestens einer der Bindungspartner des Probenkomplexes ein Biomolekül ist.
11. Verfahren nach einem der vorstehenden Ansprüche, wobei der erste und/oder vierte Bindungspartner an einer ersten bzw. zweiten Halteeinrichtung befestigt werden, die vorzugsweise jeweils einen Körper aufweisen.
12. Verfahren nach einem der Ansprüche 9 bis 11, wobei mindestens ein Körper eine makroskopisch große Oberfläche aufweist, mit der vorzugsweise mehrere Probenkomplexe und/oder Referenzkomplexe verbindbar sind.
13. Verfahren nach einem der Ansprüche 9 bis 12, wobei mindestens ein Körper nanoskopisch klein ist, vorzugsweise ausgewählt aus einer Gruppe, die Partikel, magnetische Partikel, paramagnetische Partikel, diamagnetische Partikel, Kolloide, Moleküle, geladene Moleküle, Polymere, und vielfach geladene Polymere aufweist.
14. Verfahren nach einem der vorstehenden Ansprüche, wobei die Kraft zur Trennung der Verkettung durch einen makroskopischen Zug aufgebracht wird.

15. Verfahren nach einem der vorstehenden Ansprüche, wobei die Kraft durch ein magnetisches Feld aufgebracht wird.
16. Verfahren nach einem der vorstehenden Ansprüche, wobei die Kraft durch eine hydrodynamische Strömung aufgebracht wird.
17. Verfahren nach einem der vorstehenden Ansprüche, wobei die Kraft durch Einkoppeln von Schallwellen, vorzugsweise Ultraschallwellen aufgebracht wird.
18. Verfahren nach einem der vorstehenden Ansprüche, wobei die Kraft durch Aufbringen elektrostatischer Kräfte aufgebaut wird.
19. Verfahren nach einem der vorstehenden Ansprüche, wobei die Kraft durch molekulare Konformationsänderungen von Aufhängungen und/oder der Verbindungen aufgebracht wird.
20. Verfahren nach einem der vorstehenden Ansprüche, wobei eine Kraft unter Einhaltung einer bestimmten Krafrate angelegt wird.
21. Verfahren nach Anspruch 20, wobei das Einstellen der Krafrate über die Ziehgeschwindigkeit erfolgt, mit der die Halteeinrichtungen getrennt werden.
22. Verfahren nach Anspruch 20 oder 21, wobei das Einstellen der Krafrate über die Federkonstante der Verkettung mit ihren Anbindungen erfolgt.
23. Verfahren nach Anspruch 22, wobei das Einstellen der Federkonstante über die Variation der Länge eines Polymers aus dem die Anbindungen der Liganden bzw. die Verbindung, die die Rezeptoren verbindet, erfolgt.
24. Verfahren nach einem der vorstehenden Ansprüche, wobei ein Probenkomplex und/oder ein Referenzkomplex mindestens einen Bestandteil aufweist, der ausgewählt wird aus einer Gruppe, die niedermolekulare Substanzen, Polymere, Proteine, Antikörper, Antigene, Haptene, natürliche oder künstliche Nukleinsäuren, Partikel, Viren, Phagen, Zellen, Zellbestandteile und/oder komplexbildende Substanzen wie Chelatoren aufweist.

25. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 24, mit den Schritten Immobilisieren des ersten Bindungspartners an einer ersten Halteeinrichtung, Immobilisieren des vierten Bindungspartners an einer zweiten Halteeinrichtung, Bereitstellen eines Konjugats aus dem zweiten und dritten Bindungspartner, das die Probe darstellt, wobei der zweite Bindungspartner an den ersten Bindungspartner binden kann und der dritte Bindungspartner an den vierten Bindungspartner binden kann, Annähern der ersten und der zweiten Halteeinrichtung, wobei die Bindungspartner der Probe mit den beiden anderen zugeordneten Bindungspartnern in Wechselwirkung treten können.
26. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 24, mit den Schritten Immobilisieren des ersten Bindungspartners, der die Probe darstellt, an einer ersten Halteeinrichtung, Immobilisieren des vierten Bindungspartners an einer zweiten Halteeinrichtung, Bereitstellen eines Konjugats aus dem zweiten und dem dritten Bindungspartner, wobei der zweite Bindungspartner an die Probe binden kann, und der dritte Bindungspartner an den vierten Bindungspartner binden kann, Annähern der ersten und der zweiten Halteeinrichtung, wobei die zugeordneten Bindungspartner in Wechselwirkung treten können.
27. Verfahren nach einem der vorstehenden Ansprüche mit dem Schritt, Markieren des Probenkomplexes und/oder des Referenzkomplexes, vorzugsweise mindestens eines Bindungspartners und indirekte oder direkte Detektion der Trennstelle, die sich nach dem Aufbringen der Kraft ergibt.
28. Verfahren nach Anspruch 27, wobei das Konjugat aus zweitem und drittem Bindungspartner, der zweite Bindungspartner oder der dritte Bindungspartner mit einer ersten Markierung versehen werden, und der erste oder der vierte Bindungspartner mit einer zweiten Markierung versehen werden, die von der ersten Markierung verschieden ist.
29. Verfahren nach Anspruch 28, wobei die Detektion der Trennstelle dadurch erfolgt, daß man die Menge an erster Markierung ermittelt, die an eine der Halteeinrichtungen gebunden ist, die Menge an zweiter Markierung ermittelt, die an dieselbe Halteeinrichtung gebunden ist, und die ermittelten Werte miteinander vergleicht und/oder

zueinander in Beziehung setzt.

30. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 3, 5 bis 24 oder 27 bis 29, dadurch gekennzeichnet, dass zuerst die Verkettung, die den ersten, den zweiten, den dritten und den vierten Bindungspartner umfasst, auf einer ersten Halteeinrichtung gebildet wird und dann in einem zweiten Schritt die Kopplung mit einer zweiten Halteeinrichtung erfolgt.
31. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 3 oder 5 bis 29, dadurch gekennzeichnet, dass
  - (i) auf einer ersten Halteeinrichtung der erste Bindungspartner BP1 und das Konjugat umfassend den zweiten Bindungspartner BP2 und den dritten Bindungspartner BP3 gebunden werden,  
auf einer zweiten Halteeinrichtung der vierte Bindungspartner BP4 immobilisiert wird, die beiden Halteeinrichtungen angenähert werden, so dass der dritte Bindungspartner BP3 und der vierte Bindungspartner BP4 aneinander binden können,  
oder
  - (ii) auf der zweiten Halteeinrichtung der vierte Bindungspartner BP4 und das Konjugat umfassend den zweiten Bindungspartner BP2 und den dritten Bindungspartner BP3 gebunden werden,  
auf der ersten Halteeinrichtung der erste Bindungspartner BP1 immobilisiert wird, die beiden Halteeinrichtungen angenähert werden, so dass der zweite Bindungspartner BP2 und der erste Bindungspartner BP1 aneinander binden können.
32. Verfahren nach einem der Ansprüche 27 bis 31, wobei mindestens einer der Bindungspartner eine Nukleinsäure, insbesondere DNA, umfasst.
33. Verfahren nach einem der Ansprüche 27 bis 32, wobei mindestens zwei der Bindungspartner eine natürliche oder künstliche Nukleinsäure umfassen.
34. Verfahren nach einem der Ansprüche 27 bis 33, wobei die Markierung durch fluoreszierende Moleküle erfolgt.
35. Verfahren nach Anspruch 34, wobei ein Bindungspartner eines Bindungskomplexes mit einem ersten Fluorophor und der zweite Bindungspartner mit einem zweiten Fluorophor

versehen ist, zwischen denen ein Fluoreszenz Resonanz Transfer (FRET) stattfindet.

36. Verfahren nach Anspruch 34, wobei ein Bindungspartner eines Bindungskomplexes mit einem Fluorophor und der zweite Bindungspartner mit einem Molekül versehen ist, der die Fluoreszenz des Fluorophors auslöscht (quenching).
37. Verfahren nach einem der Ansprüche 27 bis 33, wobei es sich bei der Markierung um fluoreszierende nanoskopische Halbleiterpartikel (quantum dots) handelt.
38. Verfahren nach einem der Ansprüche 27 bis 33, wobei es sich um eine radioaktive Markierung handelt.
39. Verfahren nach einem der Ansprüche 27 bis 33, wobei es sich bei der Markierung um ein Enzym oder einen Affinitätsmarker handelt, an den ein Enzym binden kann, das durch eine Reaktion einen Signalstoff entwickelt.
40. Verfahren nach Anspruch 39, wobei an die Trennung eines Komplexes die Aktivierung eines Enzyms gekoppelt ist, welches ein detektierbares Signal entwickelt
41. Verfahren nach einem der Ansprüche 27 bis 33, wobei es sich bei der Markierung um ein Molekül der Elektrolumineszenz, ein elektrochemisch detektierbares Molekül oder um eine Massenmarkierung handelt, die durch Massenspektroskopie nachgewiesen werden kann.
42. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 41, wobei das Verfahren an vielen gleichartigen Verkettungen durchgeführt wird.
43. Verfahren nach Anspruch 42, wobei nur eine Art Verkettung bei nur einer Kraftrate getestet wird, wobei die Verkettung stets den gleichen Probenkomplex und stets den gleichen Referenzkomplex beinhaltet.
44. Verfahren nach Anspruch 42, wobei nur eine Art Verkettung bei verschiedenen Kraftraten getestet wird, wobei die Verkettung stets den gleichen Probenkomplex und stets den gleichen Referenzkomplex beinhaltet.

45. Verfahren nach Anspruch 42, wobei verschiedene Verkettungen bei nur einer Kraftrate getestet werden, wobei die Verkettungen stets den gleichen Probenkomplex aber verschiedene Referenzkomplexe mit verschiedenen Trennkräften beinhaltet.
46. Verfahren nach Anspruch 42, wobei verschiedene Verkettungen bei verschiedenen Kraftraten getestet werden, wobei die Verkettungen stets den gleichen Probenkomplex aber verschiedene Referenzkomplexe mit verschiedenen Trennkräften beinhalten.
47. Verfahren nach einem der Ansprüche 44 bis 46, wobei die Verkettungen seriell an nur einem Ansatz getestet werden.
48. Verfahren nach einem der Ansprüche 44 bis 46, wobei die verschiedenen Verkettungen bzw. Kraftraten in separaten Ansätzen vorzugsweise parallel getestet werden.
49. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass man weiterhin wenigstens ungefähr die Kopplungszahl oder/und die Kopplungseffizienz, nämlich den Quotienten aus der Anzahl der tatsächlich gebildeten Kopplungen und der Anzahl der maximal möglichen Kopplungen, bestimmt, und gegebenenfalls die Kopplungszahl oder/und die Kopplungseffizienz bei der Bestimmung, ob der Probenkomplex oder der Referenzkomplex getrennt wurde, berücksichtigt.
50. Verfahren nach Anspruch 49, dadurch gekennzeichnet, dass
  - (i) in einem ersten Schritt (=Kraftvergleich) die Menge an Konjugat umfassend den zweiten Bindungspartner BP2 und den dritten Bindungspartner BP3 bestimmt wird, die nach der Trennung von einer ersten Halteeinrichtung auf eine zweite Halteeinrichtung übertragen wurde, und/oder die Menge an Konjugat umfassend den zweiten Bindungspartner BP2 und den dritten Bindungspartner BP3 bestimmt wird, die nach der Trennung nicht von der ersten Halteeinrichtung auf die zweite Halteeinrichtung übertragen wurde,  
wobei der erste Bindungspartner BP1 von dem vierten Bindungspartner BP4 verschieden ist,
  - (ii) in einem zweiten Schritt (=Selbstvergleich) zur Bestimmung der Kopplungseffizienz

die Menge an Konjugat umfassend den zweiten Bindungspartner BP2 und den dritten Bindungspartner BP3 bestimmt wird, die nach der Trennung von einer ersten Halteeinrichtung auf eine zweite Halteeinrichtung übertragen wurde, und/oder die Menge an Konjugat umfassend den zweiten Bindungspartner BP2 und den dritten Bindungspartner BP3 bestimmt wird, die nach der Trennung nicht von der ersten Halteeinrichtung auf die zweite Halteeinrichtung übertragen wurde,  
wobei der erste Bindungspartner BP1 auch als vierter Bindungspartner BP4 eingesetzt wird, oder der vierte Bindungspartner BP4 auch als erster Bindungspartner BP1 eingesetzt wird, so dass der erste Bindungspartner BP1 und der vierte Bindungspartner BP4 in dem zweiten Schritt identisch sind, und der zweite Bindungspartner BP2 im wesentlichen identisch mit dem dritten Bindungspartner BP3 ist.

51. Verfahren nach Anspruch 49, dadurch gekennzeichnet, dass

(i) auf einer ersten Halteeinrichtung der erste Bindungspartner BP1 und das Konjugat umfassend den zweiten Bindungspartner BP2 und den dritten Bindungspartner BP3 gebunden werden,

auf einer zweiten Halteeinrichtung der vierte Bindungspartner BP4 immobilisiert wird, die beiden Halteeinrichtungen angenähert werden, so dass der dritte Bindungspartner BP3 und der vierte Bindungspartner BP4 aneinander binden können,

die Menge an Konjugat umfassend den zweiten Bindungspartner BP2 und den dritten Bindungspartner BP3 bestimmt wird, die nach der Trennung von der ersten Halteeinrichtung auf die zweite Halteeinrichtung übertragen wurde, und/oder die Menge an Konjugat umfassend den zweiten Bindungspartner BP2 und den dritten Bindungspartner BP3 bestimmt wird, die nach der Trennung nicht von der ersten Halteeinrichtung auf die zweite Halteeinrichtung übertragen wurde;

(ii) auf der zweiten Halteeinrichtung der vierte Bindungspartner BP4 und das Konjugat umfassend den zweiten Bindungspartner BP2 und den dritten Bindungspartner BP3 gebunden werden,

auf der ersten Halteeinrichtung der erste Bindungspartner BP1 immobilisiert wird, die beiden Halteeinrichtungen angenähert werden, so dass der zweite Bindungspartner

BP2 und der erste Bindungspartner BP1 aneinander binden können, die Menge an Konjugat umfassend den zweiten Bindungspartner BP2 und den dritten Bindungspartner BP3 bestimmt wird, die nach der Trennung von der zweiten Halteeinrichtung auf die erste Halteeinrichtung übertragen wurde, und/oder die Menge an Konjugat umfassend den zweiten Bindungspartner BP2 und den dritten Bindungspartner BP3 bestimmt wird, die nach der Trennung nicht von der zweiten Halteeinrichtung auf die erste Halteeinrichtung übertragen wurde.

52. Vorrichtung zur Charakterisierung und/oder zum Nachweis eines Bindungskomplexes, mit:  
einem ersten Bindungspartner und einem Konjugat aus einem zweiten und einem dritten Bindungspartner und einem vierten Bindungspartner,  
einer Einrichtung zum Verketten der Bindungspartner, wobei der erste Bindungspartner mit dem zweiten Bindungspartner einen Probenkomplex und der dritte Bindungspartner mit dem vierten Bindungspartner einen Referenzkomplex ausbildet,  
einer Einrichtung zum Aufbringen einer Kraft an die Verkettung, die zur Trennung des Probenkomplexes oder des Referenzkomplexes führt und  
einer Einrichtung zum Bestimmen welcher der beiden Bindungskomplexe getrennt wurde.
53. Vorrichtung nach Anspruch 52, wobei zunächst das Konjugat aus dem zweiten und dritten Bindungspartner bereitgestellt wird und anschließend der Probenkomplex und/oder der Referenzkomplex gebildet wird.
54. Vorrichtung nach Anspruch 52, wobei zunächst der Probenkomplex und/oder der Referenzkomplex gebildet wird und anschließend das Konjugat durch Verbinden des zweiten und dritten Bindungspartners bereitgestellt wird.
55. Vorrichtung nach Anspruch 54, wobei der erste Bindungspartner an einer ersten Halteeinrichtung immobilisiert ist, der vierte Bindungspartner an einer zweiten Halteeinrichtung immobilisiert ist, der zweite Bindungspartner mit dem ersten Bindungspartner den Probenkomplex bildet, und der dritte Bindungspartner mit dem

vierten Bindungspartner den Referenzkomplex bildet, und mit einer Einrichtung zum Annähern der ersten und der zweiten Halteeinrichtung, wobei der zweite und der dritte Bindungspartner in Wechselwirkung treten können.

56. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 52 bis 55, wobei der erste Bindungspartner und der vierte Bindungspartner gleich sind.
57. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 52 bis 56, wobei es sich bei dem ersten und dem zweiten Bindungspartner um einen Liganden und einen Rezeptor handelt, die spezifisch aneinander binden.
58. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 52 bis 56, wobei der Probenkomplex auf einer unspezifischen Wechselwirkung beruht.
59. Vorrichtung nach Ansprüche 52 bis 58, wobei der Referenzkomplex auf einer spezifischen oder einer unspezifischen Wechselwirkung beruht.
60. Vorrichtung nach Ansprüche 52 bis 59, wobei mindestens einer der Bindungspartner vorzugsweise des Probenkomplexes ein Körper ist.
61. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 52 bis 60, wobei mindestens einer der Bindungspartner des Probenkomplexes ein Biomolekül ist.
62. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 52 bis 61, wobei der erste und/oder vierte Bindungspartner an einer ersten bzw. zweiten Halteeinrichtung befestigt werden, die vorzugsweise jeweils einen Körper aufweisen.
63. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 60 bis 62, wobei mindestens ein Körper eine makroskopisch große Oberfläche aufweist, mit der vorzugsweise mehrere Probenkomplexe und/oder Referenzkomplexe verbindbar sind.
64. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 60 bis 63, wobei mindestens ein Körper nanoskopisch klein ist, vorzugsweise ausgewählt aus einer Gruppe, die Partikel, magnetische Partikel, paramagnetische Partikel, diamagnetische Partikel, Kolloide,

Moleküle, geladene Moleküle, Polymere, und vielfach geladene Polymere aufweist.

65. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 52 bis 64, wobei die Krafteinrichtung zur Trennung der Verkettung eine Einrichtung zum Aufbringen eines makroskopischen Zugs aufweist.
66. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 52 bis 65, mit einer Einrichtung zum Aufbringen von magnetischen Kräften.
67. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 52 bis 66, mit einer Einrichtung zum Aufbringen von hydrodynamischen Kräften.
68. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 52 bis 67, mit einer Einrichtung zum Einkoppeln von Schallwellen, vorzugsweise Ultraschallwellen.
69. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 52 bis 68, mit einer Einrichtung zum Aufbringen von elektrostatischen Kräften.
70. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 52 bis 69, mit einer Einrichtung zum Bewirken von molekularen Konformationsänderungen von Aufhängungen und /oder der Verbindungen.
71. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 52 bis 70, wobei die Kraft unter Einhaltung einer bestimmten Kraftrate angelegt wird.
72. Vorrichtung nach Anspruch 71, mit einer Einrichtung zum Einstellen der Kraftrate, vorzugsweise der Ziehgeschwindigkeit, mit der die Halteeinrichtungen getrennt werden.
73. Vorrichtung nach Anspruch 71 oder 72, wobei die Kraftrate über die Federkonstante der Verkettung mit ihren Anbindungen einstellbar ist.
74. Vorrichtung nach Anspruch 73, wobei die Federkonstante über die Variation der Länge eines Polymers aus dem die Anbindungen der Liganden bzw. die Verbindung, die die Rezeptoren verbindet, bestehen, einstellbar ist.

75. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 52 bis 74, wobei ein Probenkomplex und/oder ein Referenzkomplex mindestens einen Bestandteil aufweist, der ausgewählt wird aus einer Gruppe, die niedermolekulare Substanzen, Polymere, Proteine, Antikörper, Antigene, Haptene, natürliche oder künstliche Nukleinsäuren, Partikel, Viren, Phagen, Zellen, Zellbestandteile und/oder komplexbildende Substanzen wie Chelatoren aufweist.
76. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 52 bis 75, wobei der erste Bindungspartner an einer ersten Haltevorrichtung immobilisiert ist, der vierte Bindungspartner an einer zweiten Halteeinrichtung immobilisiert ist, ein Konjugat aus dem zweiten und dritten Bindungspartners besteht, das die Probe darstellt, wobei der zweite Bindungspartner an den ersten Bindungspartner binden kann und der dritte Bindungspartner an den vierten Bindungspartner binden kann, und mit einer Einrichtung zum Annähern der ersten und der zweiten Halteeinrichtung, wobei die Bindungspartner der Probe mit den beiden anderen zugeordneten Bindungspartnern in Wechselwirkung treten können.
77. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 52 bis 75, wobei der erste Bindungspartner, der die Probe darstellt, an einer ersten Halteeinrichtung immobilisiert ist, der vierte Bindungspartner an einer zweiten Halteeinrichtung immobilisiert ist, ein Konjugat aus dem zweiten und dem dritten Bindungspartner besteht, wobei der zweite Bindungspartner an die Probe binden kann, und der dritte Bindungspartner an den vierten Bindungspartner binden kann, und mit einer Einrichtung zum Annähern der ersten und der zweiten Halteeinrichtung, wobei die zugeordneten Bindungspartner in Wechselwirkung treten können.
78. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 52 bis 77 mit einer Markierung an dem Probenkomplex und/oder dem Referenzkomplex, vorzugsweise mindestens einem Bindungspartner und einer Einrichtung zum indirekten oder direkten Detektieren der Trennstelle, die sich nach dem Aufbringen der Kraft ergibt.
79. Vorrichtung nach Anspruch 78 mit einer ersten Markierung an dem Konjugat aus dem zweiten und dritten Bindungspartner und einer zweiten Markierung an dem ersten oder vierten Bindungspartner, wobei die zweite Markierung von der ersten Markierung verschieden ist.

80. Vorrichtung nach Anspruch 78 oder 79, wobei die Markierung durch fluoreszierende Moleküle erfolgt.
81. Vorrichtung nach Anspruch 80, wobei ein Bindungspartner eines Bindungskomplexes mit einem ersten Fluorophor und der zweite Bindungspartner mit einem zweiten Fluorophor versehen ist, zwischen denen ein Fluoreszenz Resonanz Transfer (FRET) stattfindet.
82. Vorrichtung nach Anspruch 80, wobei ein Bindungspartner eines Bindungskomplexes mit einem Fluorophor und der zweite Bindungspartner mit einem Molekül versehen ist, der die Fluoreszenz des Fluorophors auslöscht (quenching).
83. Vorrichtung nach Anspruch 78 oder 79, wobei es sich bei der Markierung um fluoreszierende nanoskopische Halbleiterpartikel (quantum dots) handelt.
84. Vorrichtung nach Anspruch 78 oder 79, wobei die Markierung radioaktiv ist.
85. Vorrichtung nach Anspruch 78 oder 79, wobei die Markierung ein Enzym oder einen Affinitätsmarker aufweist, an den ein Enzym binden kann, das durch eine Reaktion einen Signalstoff entwickelt.
86. Vorrichtung nach Anspruch 85, wobei an die Trennung eines Komplexes die Aktivierung eines Enzyms gekoppelt ist, welches ein detektierbares Signal entwickelt.
87. Vorrichtung nach Anspruch 78 oder 79, wobei es sich bei der Markierung um ein Molekül der Elektrolumineszenz, ein elektrochemisch detektierbares Molekül oder um eine Massenmarkierung handelt, die durch Massenspektroskopie nachgewiesen werden kann.
88. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 52 bis 87, mit vielen gleichartigen Verkettungen, an denen der Meßvorgang durchgeführt wird.
89. Vorrichtung nach Anspruch 88, wobei nur eine Art Verkettung bei nur einer Kraftrate getestet wird, wobei die Verkettung stets den gleichen Probenkomplex und stets den

gleichen Referenzkomplex beinhaltet.

90. Vorrichtung nach Anspruch 88, wobei nur eine Art Verkettung bei verschiedenen Kraftraten getestet wird, wobei die Verkettung stets den gleichen Probenkomplex und stets den gleichen Referenzkomplex beinhaltet.
91. Vorrichtung nach Anspruch 88, wobei verschiedene Verkettungen bei nur einer Kraftrate getestet werden, wobei die Verkettungen stets den gleichen Probenkomplex aber verschiedene Referenzkomplexe mit verschiedenen Trennkräften beinhaltet.
92. Vorrichtung nach Anspruch 88, wobei verschiedene Verkettungen bei verschiedenen Kraftraten getestet werden, wobei die Verkettungen stets den gleichen Probenkomplex aber verschiedene Referenzkomplexe mit verschiedenen Trennkräften beinhalten.
93. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 90 bis 92, wobei die Verkettungen seriell an nur einem Ansatz getestet werden.
94. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 90 bis 92, wobei die verschiedenen Verkettungen bzw. Kraftraten in separaten Ansätzen vorzugsweise parallel getestet werden.
95. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 52 bis 94, wobei die Trennkräfte der Referenzkomplexe so gewählt sind, daß sich die Trennkraft des Probenkomplexes näherungsweise bestimmen läßt.
96. Kit zum Nachweis eines Bindungskomplexes zum Durchführen eines Verfahrens nach mindestens einem der Ansprüche 1 bis 51.
97. Kit zum Nachweis eines Bindungskomplexes mit den Einrichtungen nach mindestens einem der Ansprüche 52 bis 95.

1/17

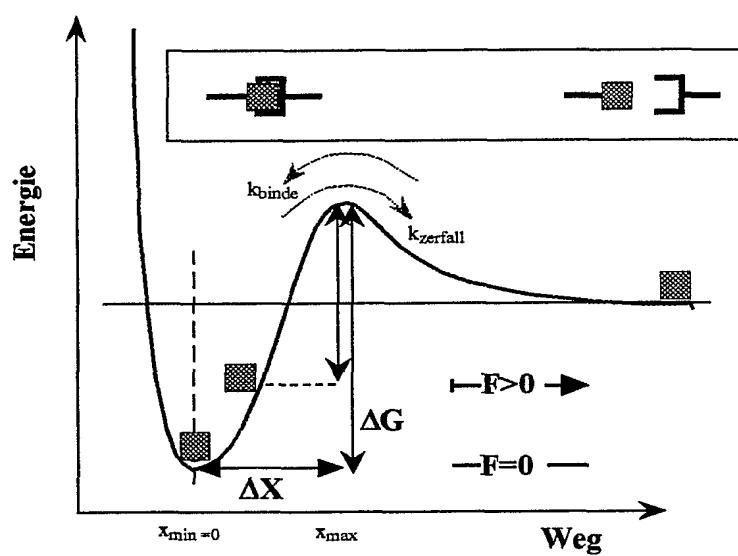


Fig. 1

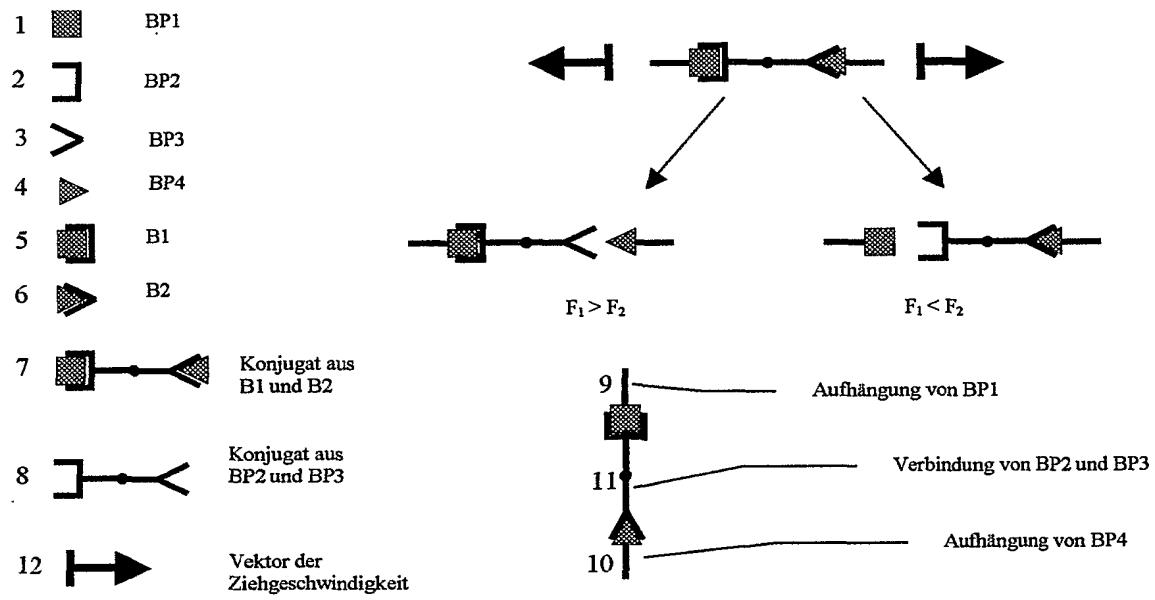


Fig. 2

3/17

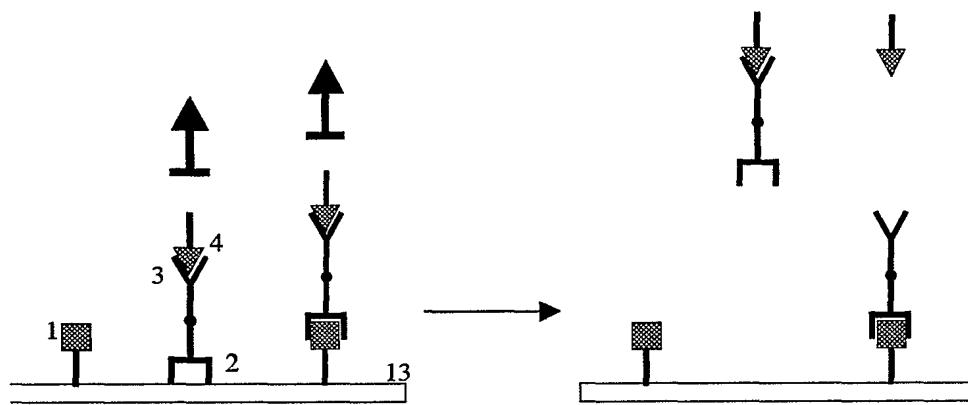


Fig. 3

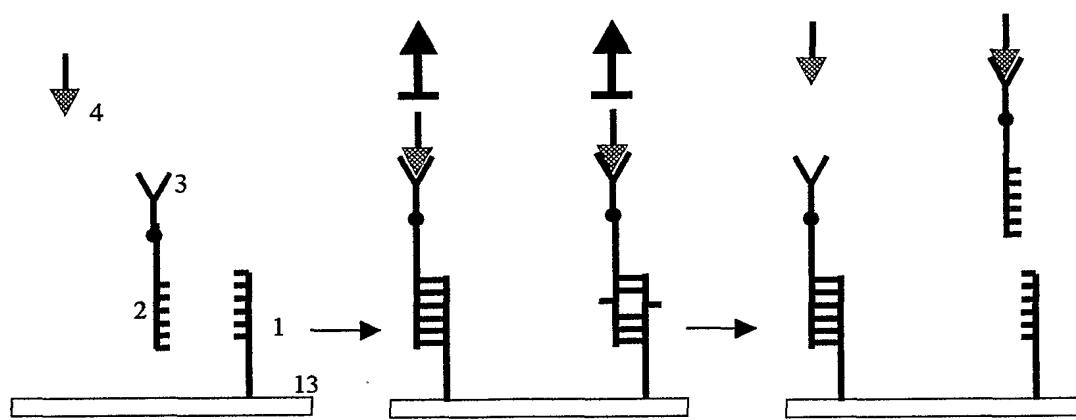


Fig. 4

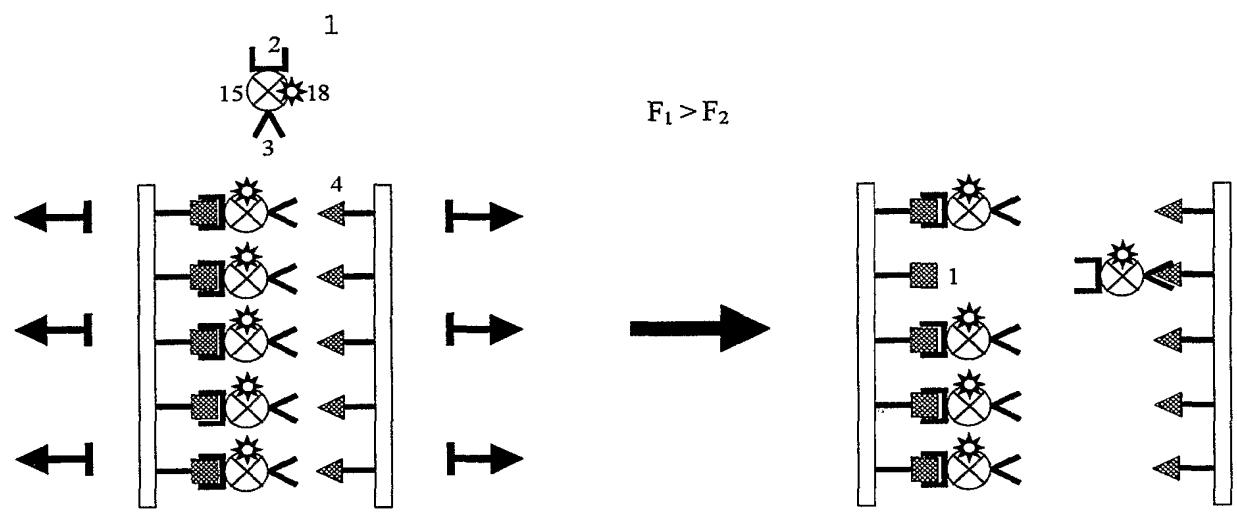


Fig. 5

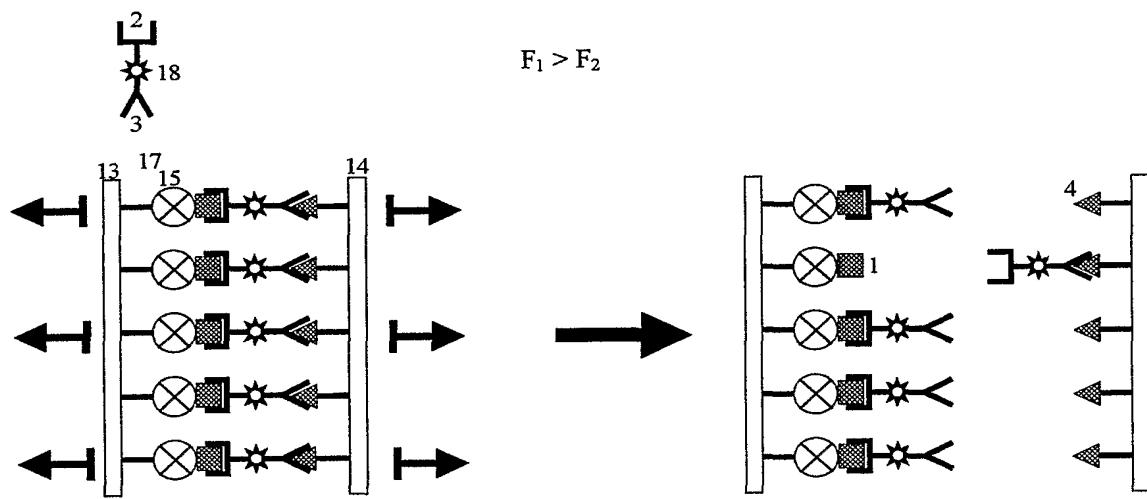


Fig. 6

7/17

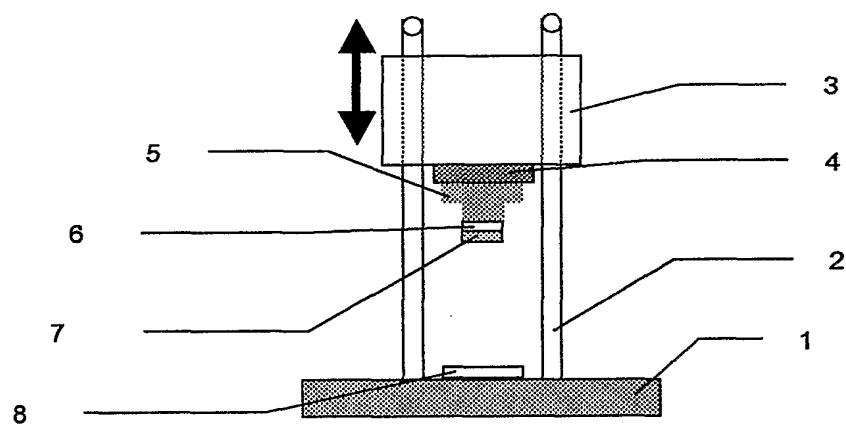
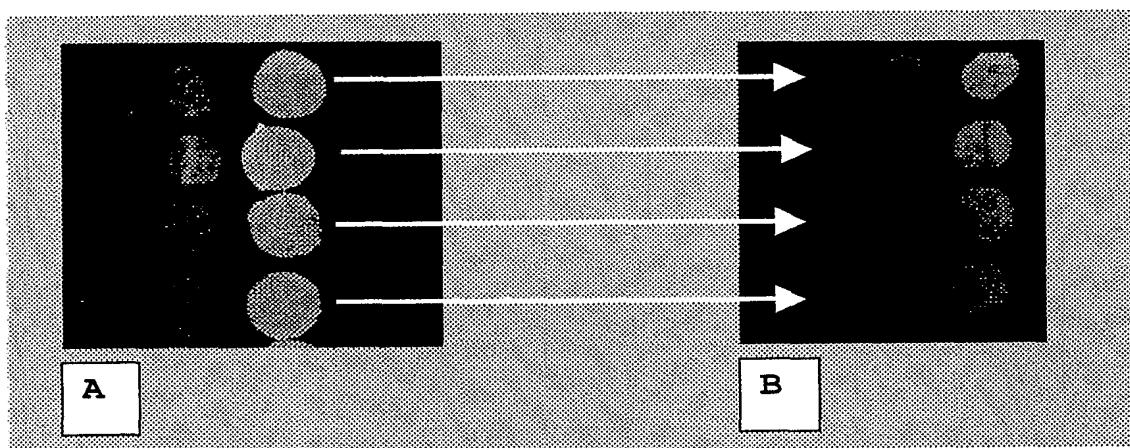
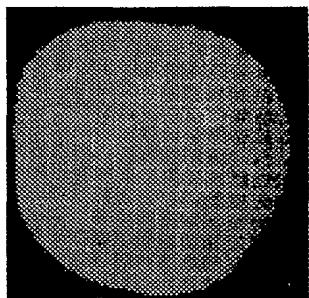


Fig. 7

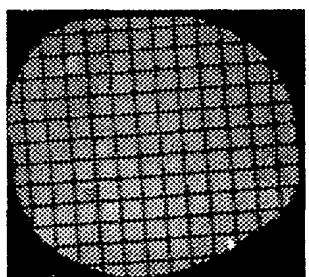


Figur 8

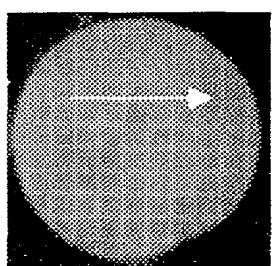
9/17



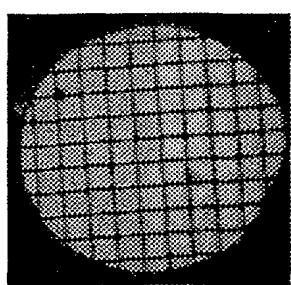
Figur 9A



Figur 9B

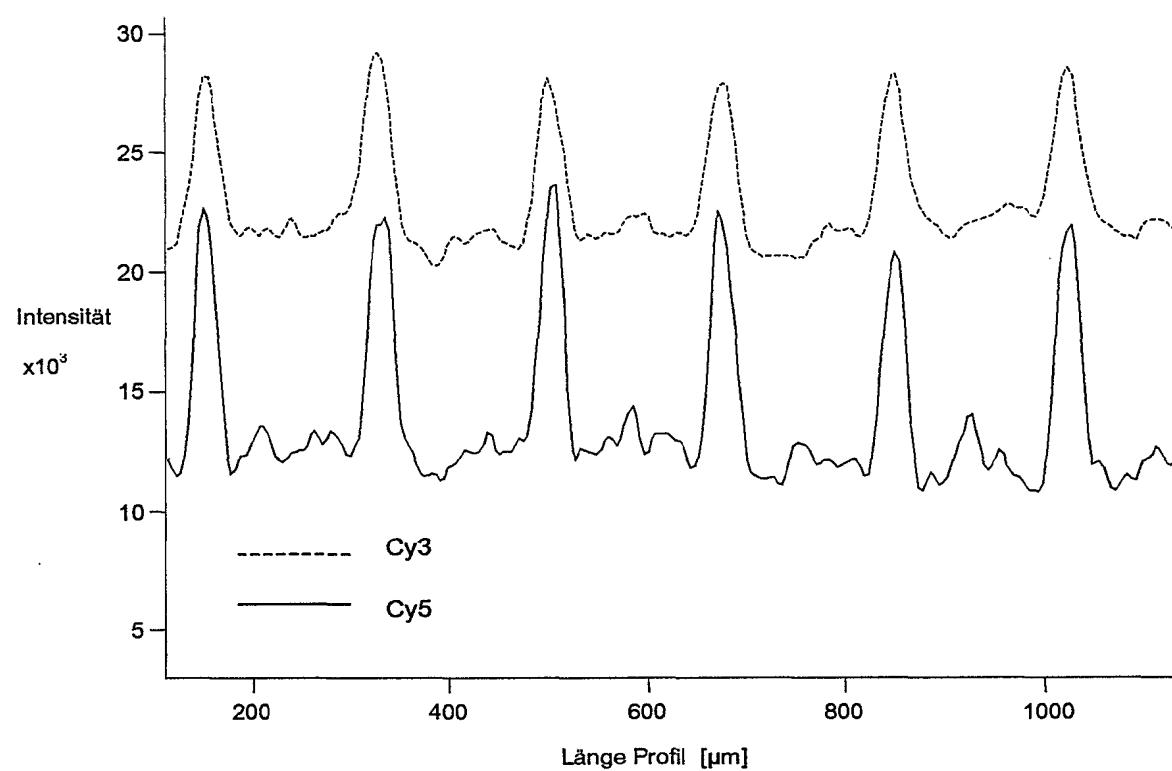


Figur 9C



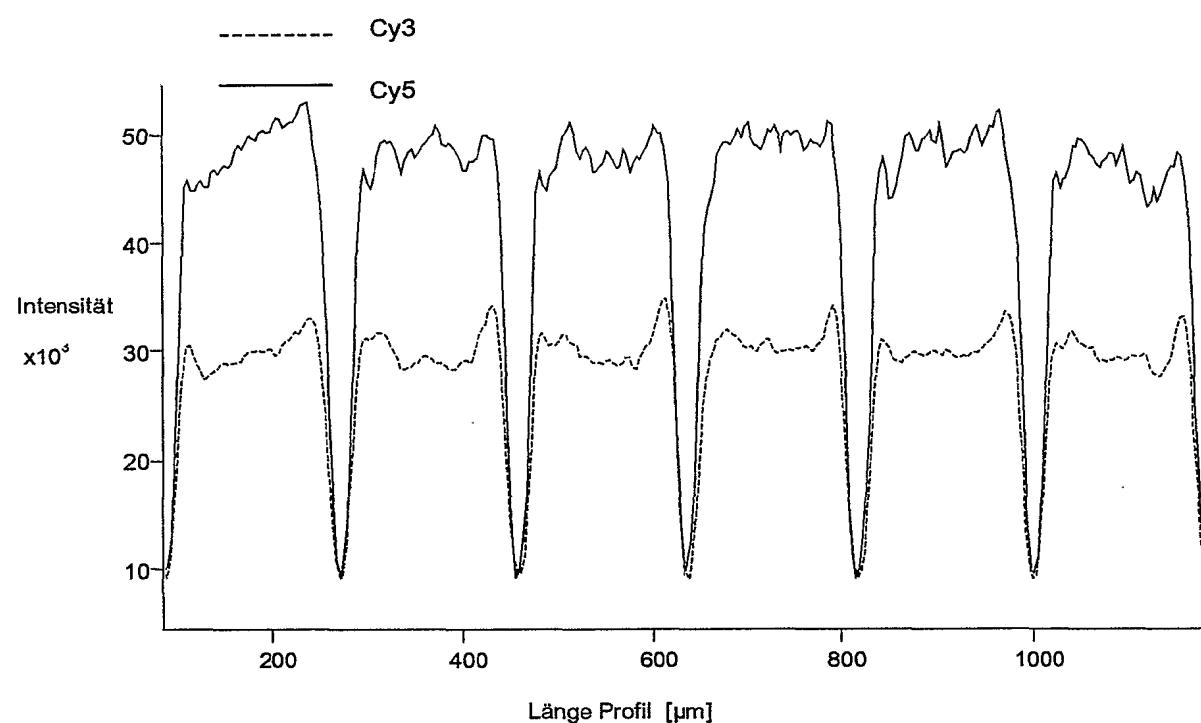
Figur 9D

10/17



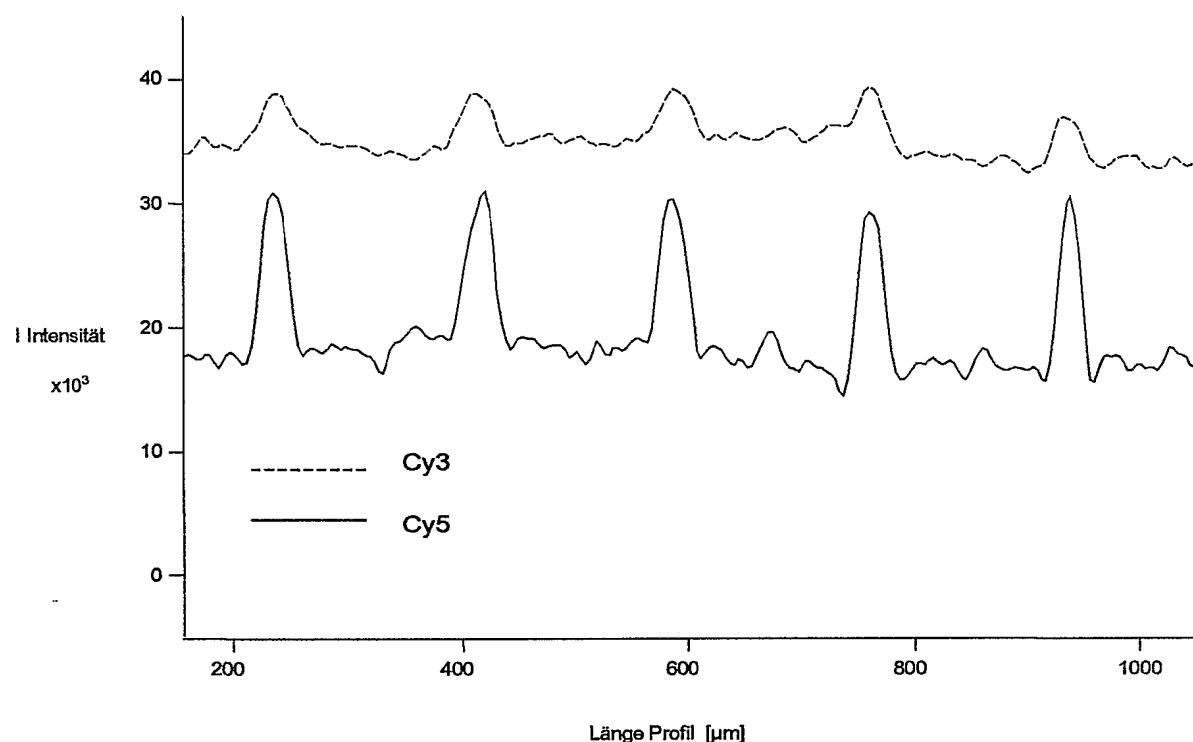
Figur 10A

11/17



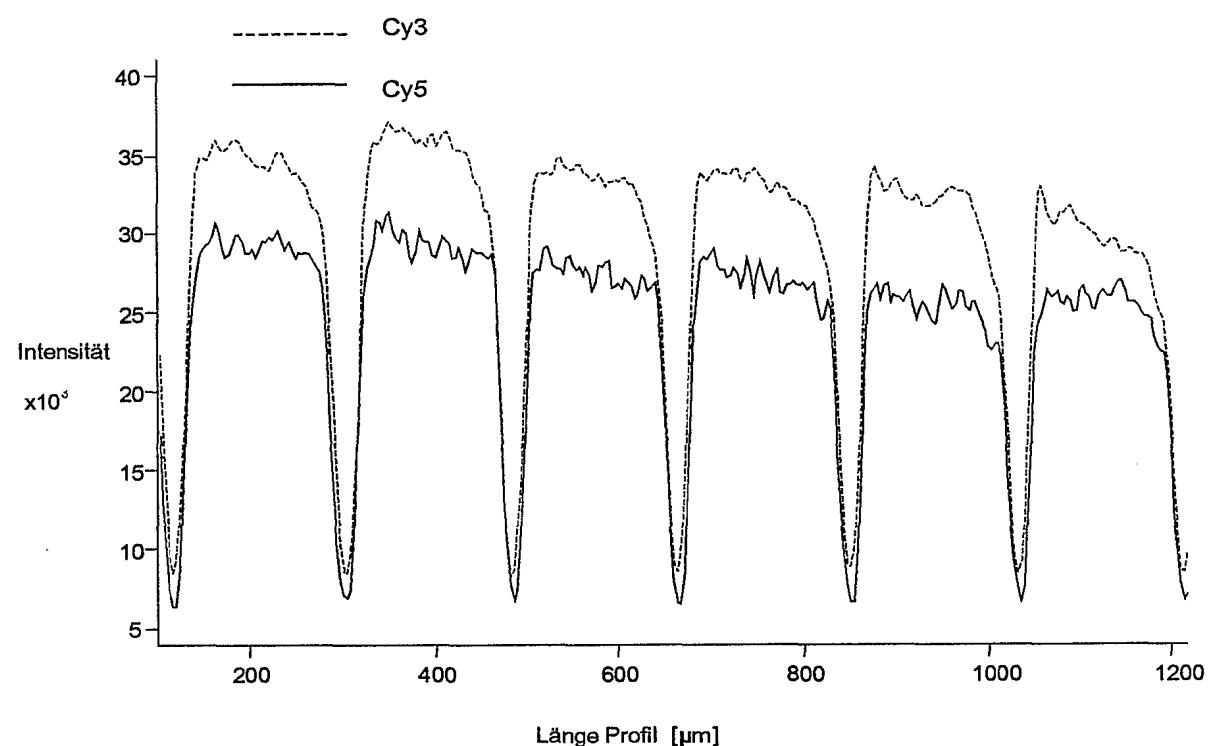
Figur 10B

12/17



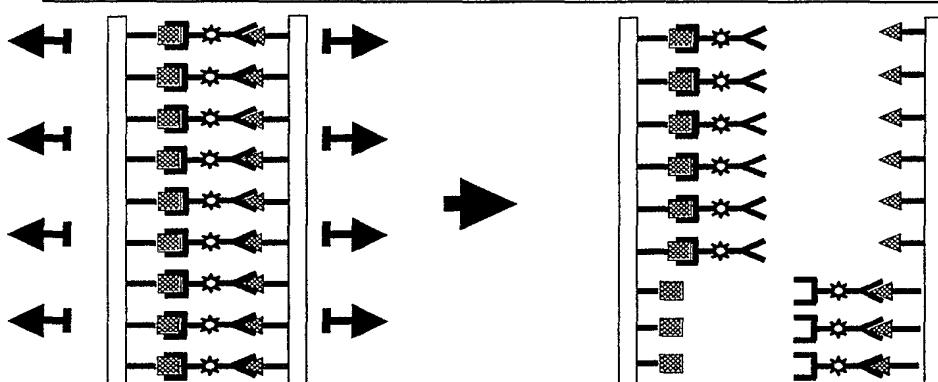
Figur 10C

13/17

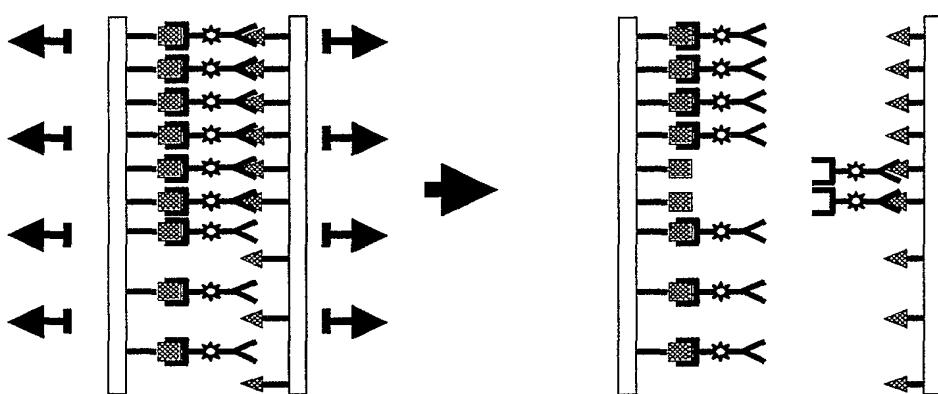


Figur 10D

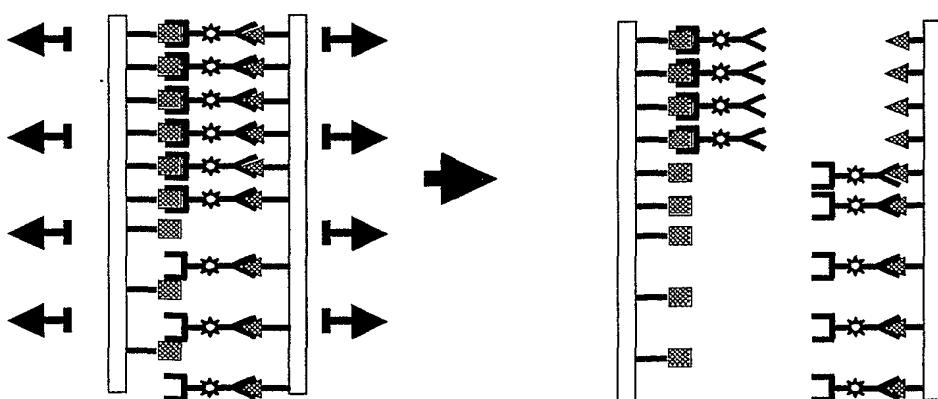
A) Idealfall:



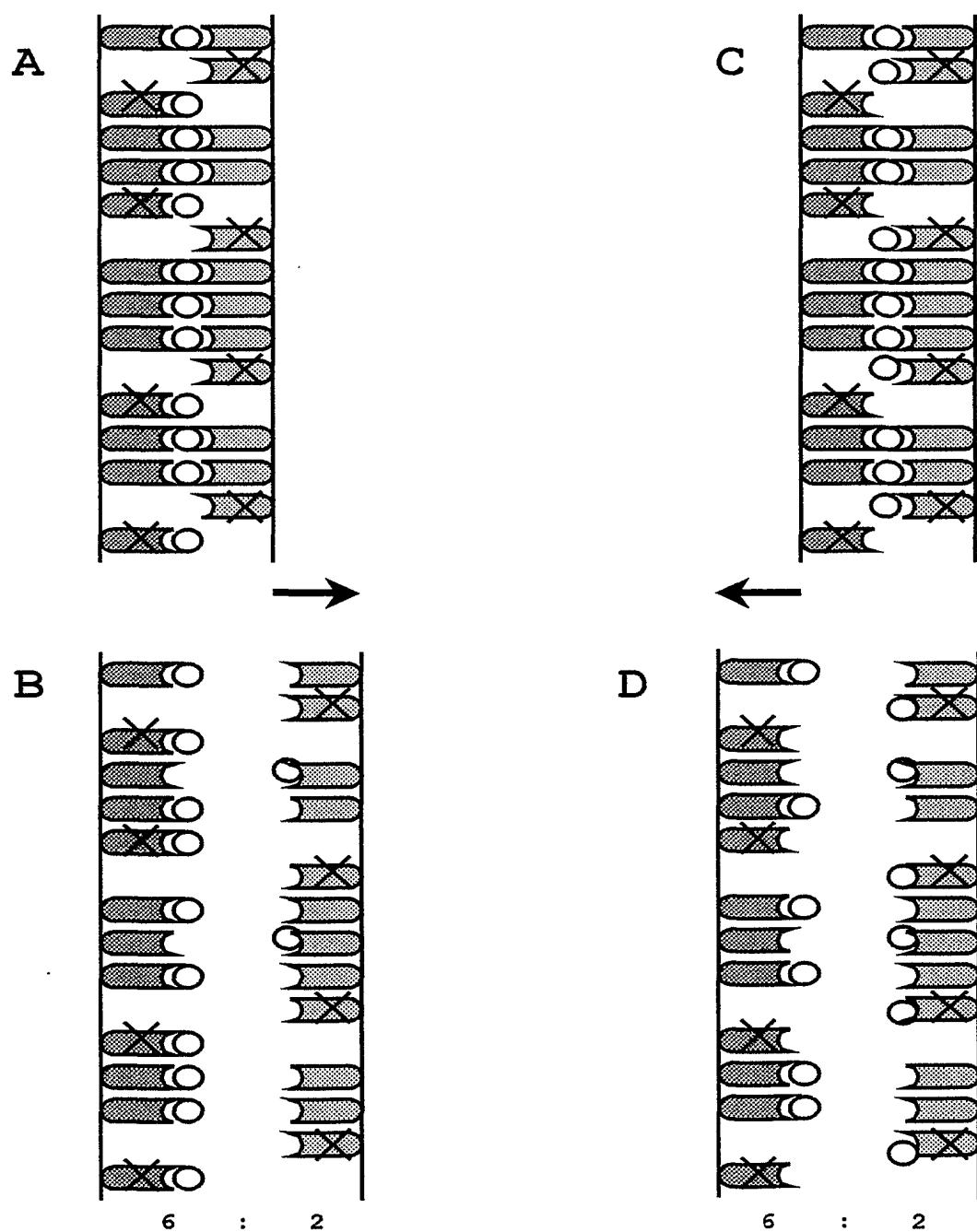
B) Nach Präinkubation auf der linken Oberfläche:



C) Nach Präinkubation auf der rechten Oberfläche:



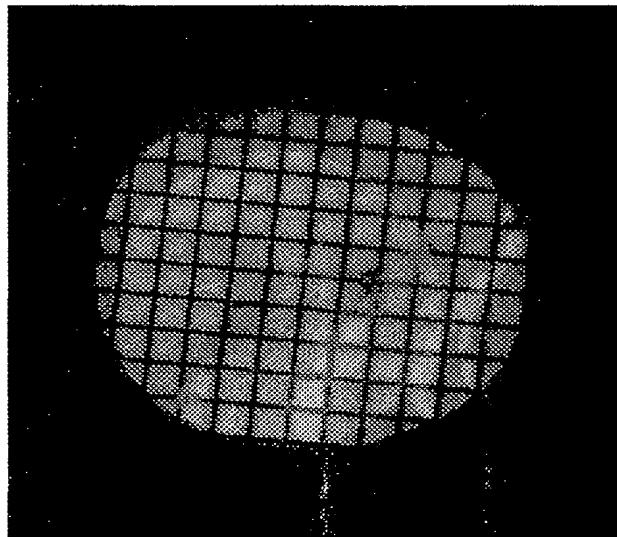
Figur 11



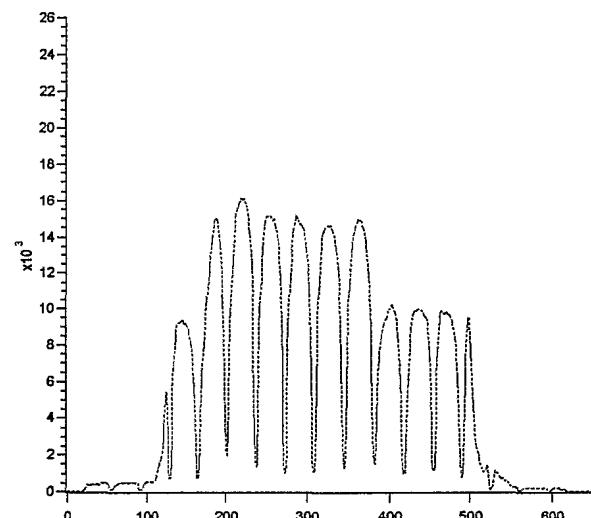
Figur 12

16/17

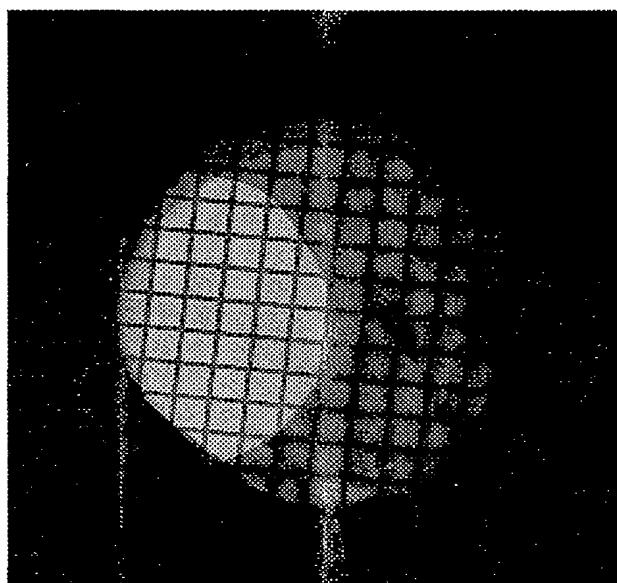
Beispiele für Messergebnisse zum reversen Stempeln des Streptavidins von Biotin auf Desthiobiotin und umgekehrt.



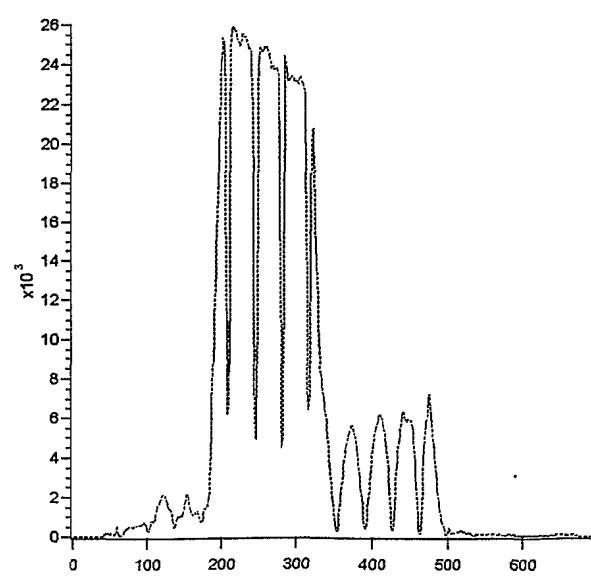
A1) Streptavidin-Übertrag von einem Stempel mit Biotin eine Unterlage mit Desthiobiotin



A2) Linescan zur Ermittlung der Intensitäten einer Reihe mit



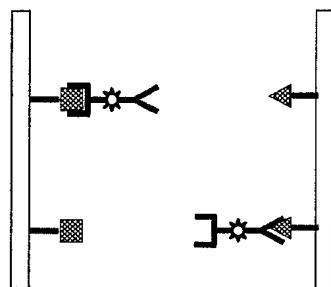
B1) Streptavidin-Übertrag von einem Stempel mit Desthiobiotin auf eine Unterlage mit Biotin



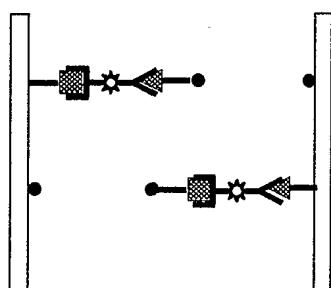
B2) Linescan zur Ermittlung der Intensitäten einer Reihe mit

Figur 13

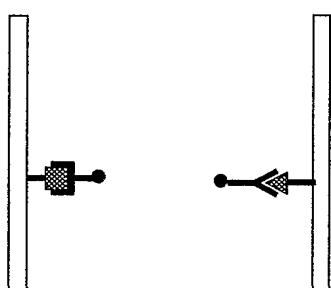
1.



2.



3.



- Kopplungspartner, sofern nicht mit Bindungspartner identisch

Obwohl in Fall 3 nicht dargestellt, kann der zweite Bindungspartner und/oder der dritte Bindungspartner eine Markierung enthalten.

Figur 14

1

## SEQUENZPROTOKOLL

&lt;110&gt; Nanotype GmbH

<120> Verfahren und Vorrichtung zur Charakterisierung  
und/oder zum Nachweis eines Bindungskomplexes

&lt;130&gt; differentieller Krafttest

&lt;140&gt;

&lt;141&gt;

&lt;150&gt; DE10039393.4

&lt;151&gt; 2000-08-11

&lt;150&gt; DE10051143.0

&lt;151&gt; 2000-10-16

&lt;150&gt; DE10117866.2

&lt;151&gt; 2001-04-10

&lt;160&gt; 4

&lt;170&gt; PatentIn Ver. 2.1

&lt;210&gt; 1

&lt;211&gt; 30

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Künstliche Sequenz

&lt;220&gt;

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:  
Oligonukleotid

&lt;400&gt; 1

aaaaaaaaaa tctccggctt tacggcgtat

30

&lt;210&gt; 2

&lt;211&gt; 72

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Künstliche Sequenz

&lt;220&gt;

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:  
oligonukleotid

&lt;400&gt; 2

2

ttgctccag actctctgct gaaaagtccct ttgataatcg taacgagggg ttatacgccg 60  
taaagccgga ga 72

<210> 3  
<211> 62  
<212> DNA  
<213> Künstliche Sequenz

<220>  
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:  
Oligonukleotid

<400> 3  
actctctgct gaaaagtccct ttgataatcg taacgagggg ttatacgccg taaagccgga 60  
ga 62

<210> 4  
<211> 40  
<212> DNA  
<213> Künstliche Sequenz

<220>  
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:  
Oligonukleotid

<400> 4  
agggactttc agcagagagt ctgggagcaa aaaaaaaaaa 40